



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Bp 43882
Bp 43882

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1
2006

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT »

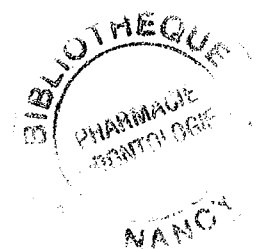
THESE

Présentée et soutenue publiquement
18 avril 2006

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ – NANCY 1

Mention Sciences du Médicament



par

Nicolas GAMBIER
Né le 13 février 1972

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies de Pharmacologie

Sujet :

Influence des interactions tabac - polymorphismes
génétiques *CYP1A1* et *CYP2A6* sur le risque
cardiovasculaire dans la cohorte STANISLAS.

MEMBRES DU JURY

Juges	Mme le Professeur Anne Marie BATT [†]	(Nancy, France)
	Mme le Docteur Sophie VISVIKIS – SIEST	(Nancy, France)
	M. le Professeur Gérard SIEST	(Nancy, France)
	M. le Professeur Pierre GILLET	(Nancy, France)
Rapporteurs	M. le Docteur Etienne ANDRE	(Castres, France)
	M. le Professeur Pierre BARTSCH	(Liège, Belgique)

*Une pensée toute particulière au **Professeur Anne-Marie BATT**.*

Dès le début de mon internat des hôpitaux et de mon arrivée à Nancy, le Professeur Anne-Marie BATT a su m'orienter, me conseiller et cerner mes faiblesses tout en m'aidant à les surmonter.

Je ne l'ai pas assez remerciée pour son écoute attentive et son encadrement personnalisé.

Durant tout mon cursus, j'ai bénéficié de ses conseils scientifiques toujours prodigués avec patience et gentillesse.

Je lui en demeure éternellement reconnaissant.

Merci...

Je tiens à remercier,

Madame le Docteur Sophie VISVIKIS-SIEST de la confiance qu'elle m'a témoigné en m'accueillant dans son laboratoire et de m'avoir guidé au long de ces années et donné les moyens de mener à bien ce travail.

Monsieur le Professeur Gérard SIEST de l'intérêt qu'il a toujours porté à ce travail et pour m'avoir guidé dans l'élaboration de ce manuscrit. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Messieurs le Docteur Etienne ANDRE et Professeur Pierre BARTSCH pour avoir accepté la charge d'être rapporteurs.

Monsieur le Professeur GILLET pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie du jury de thèse.

Je remercie Mesdames Dorothee FOERNZLER et Annick THOMPSON du laboratoire Roche Diagnostics et tous les membres de l'équipe 4 de l'unité INSERM U525, à la faculté de Pharmacie de Nancy I, en particulier Bérangère MARIE, Sandy MAUMUS et Michèle PFISTER. Ces années de thèse passées au laboratoire resteront pour moi un excellent souvenir.



HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS	1
SITUATION DU SUJET	4
1. FACTEURS GENETIQUES ET DEPENDANCE TABAGIQUE	5
1.1. CONSOMMATION DE TABAC ET DEPENDANCE	5
1.1.1. <i>Gènes impliqués dans le mécanisme d'action des substances addictives du tabac</i>	6
1.1.1.1. Récepteurs nicotiniques	6
1.1.1.2. Voie dopaminergique	8
1.1.1.2.1. Gènes des récepteurs à la dopamine	8
1.1.1.2.2. Gène transporteur de la dopamine	8
1.1.1.2.3. Gènes impliqués dans la synthèse et le métabolisme de neurotransmetteurs (dopamine et noradrénaline)	9
1.1.1.3. Voie sérotoninergique	10
1.1.1.4. Récepteurs cannabinoïdes	10
1.1.1.5. Récepteurs opiacés	10
1.1.2. <i>Gènes impliqués dans le métabolisme de la nicotine</i>	11
1.1.2.1. Métabolisme de la nicotine	11
1.1.2.2. Régulation des P450 impliqués dans le métabolisme de la nicotine	13
1.1.2.2.1. Régulation de CYP2B6	13
1.1.2.2.2. Régulation de CYP2A6	15
2. GENETIQUE DU CYTOCHROME P4502A6	17
2.1. CYTOCHROME P450 2A6	17
2.2. GENE CYP2A6	18
2.3. POLYMORPHISMES CYP2A6	20
2.3.1. <i>Allèle référent dit « sauvage » CYP2A6*1A</i>	22
2.3.2. <i>Polymorphismes localisés dans la région promotrice du gène</i>	23
2.3.2.1. Substitution nucléotidique -1013A>G	23
2.3.2.2. Substitution nucléotidique -745A>G	23
2.3.2.3. Substitution nucléotidique -48T>G site de la TATA box	24
2.3.3. <i>Polymorphismes localisés dans la région codante du gène</i>	24
2.3.3.1. Impliqués dans une diminution de l'activité enzymatique	24
2.3.3.2. Polymorphismes avec augmentation de l'activité enzymatique	25
2.3.3.2.1. Allèle CYP2A6*1X2	25
2.3.3.2.2. Allèle CYP2A6*1B	26
2.4. CONSEQUENCE DES POLYMORPHISMES DE CYP2A6	28
2.4.1. <i>Polymorphismes de CYP2A6 et cancer</i>	28
2.4.2. <i>Polymorphismes CYP2A6, nicotine et tabagisme</i>	30
2.4.2.1. Variations interindividuelles et interethniques du métabolisme de la nicotine	30
2.4.2.2. Polymorphisme CYP2A6 et dépendance nicotinique	31
2.4.2.3. Polymorphisme CYP2A6 et quantité de cigarettes fumées par jour	33
2.4.3. <i>Polymorphisme CYP2A6, tabac et maladies cardiovasculaires</i>	34
3. CYP1A1, RECEPTEUR AHR ET TABAC	36
3.1. CYP1A1 ET METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE	36
3.2. POLYMORPHISMES DE CYP1A1	38
3.3. CYP1A1 ET REGULATION PAR LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	40
3.3.1. <i>CYP1A1 et métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques</i>	40
3.3.2. <i>Régulation de CYP1A1 par AhR</i>	42
3.3.3. <i>Polymorphismes de AhR</i>	44
3.4. CYP1A1, RECEPTEUR AH ET PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES : LE POLYMORPHISME COMME MOYEN D'ETUDE	46
3.4.1. <i>Athérome</i>	46
3.4.2. <i>Hypertension artérielle</i>	47
3.4.2.1. Chez les fumeurs	47
3.4.2.2. Chez les ex-fumeurs	48
3.4.2.3. Causes possibles de ces variations de tension	48
3.4.2.3.1. Voie autre que celle de l'acide arachidonique	48
3.4.2.3.2. Voie de l'acide arachidonique	49

4. INTERACTIONS ENTRE TABAC ET POLYMORPHISMES DES GENES IMPLIQUES DANS LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.....	50
4.1. TABAC ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES	50
4.2. GENES CANDIDATS ET TABAC	50
MATERIEL ET METHODES	59
1. POPULATION ETUDIEE	60
1.1. LA COHORTE STANISLAS	60
1.2. DONNEES UTILISEES ET EXPLOITEES DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL.....	60
2. METHODOLOGIE	62
2.1. PRELEVEMENTS DE SANG.....	62
2.1.1. ECHANTILLONS D'ADN.....	62
2.2. GENOTYPAGE DU CYTOCHROME P450A6 PAR LA METHODE PCR-RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)	62
2.2.1. Principe.....	62
2.2.2. Protocole.....	63
2.2.3. Matériels et réactifs	66
2.3. GENOTYPAGE DU CYP1A1 ET RECEPTEUR AHR PAR LA METHODE « THERMOCYCLAGE CINETIQUE » OU KTC	70
2.4. STATISTIQUES.....	72
RESULTATS ET DISCUSSION	73
1. POLYMORPHISMES DU CYP2A6 ET TABAC	74
1.1. PRESENTATION DE LA POPULATION	74
1.2. DONNEES GENERALES	74
1.3. POLYMORPHISMES CYP2A6 ET TABAGISME	76
1.4. DISCUSSION.....	78
1.4.1. Polymorphismes CYP2A6 et tendance à fumer.....	78
1.4.2. Nombre de cigarettes fumées par jour et polymorphismes CYP2A6.....	79
1.5. RESUME.....	81
1.6. ARTICLE 1	82
2. POLYMORPHISMES DU CYP1A1 ET DU RECEPTEUR AHR ET TABAC	83
2.1. RESULTATS P450A1 ET RECEPTEUR AHR.....	83
2.1.1. Présentation de la population.....	83
2.1.2. Pression artérielle en fonction du statut tabagique	85
2.1.3. Pression artérielle en fonction des polymorphismes CYP1A1 T3801C et AhR G1661A	86
2.1.4. Pression artérielle en fonction du statut tabagique et du polymorphisme CYP1A1 T3801C.....	87
2.1.5. Pression artérielle chez l'ancien fumeur en fonction du délai depuis l'arrêt du tabac et le polymorphisme CYP1A1 T3801C.....	88
2.1.6. Pression artérielle en fonction du statut tabagique et des polymorphismes CYP1A1 T3801C AhR G1661A.90	
2.2. DISCUSSION P450A1 ET RECEPTEUR AHR.....	91
2.2.1. Pression artérielle en fonction du polymorphisme CYP1A1.....	91
2.2.2. Influence du polymorphisme AhR sur la tension artérielle.....	92
2.2.3. Cytochromes P450 comme gènes candidats dans la régulation de la pression artérielle	93
2.3. RESUME.....	94
2.4. ARTICLE 2	95
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	96
2.5. ARTICLE 3	102
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	103

Liste des figures

- Figure 1.** Effets de la nicotine sur la neurotransmission de la dopamine.
- Figure 2.** Principales voies de métabolisation de la nicotine chez l'homme.
- Figure 3.** Quantification des métabolites de la nicotine chez l'homme.
- Figure 4.** Régulation transcriptionnelle du gène *CYP2A6*.
- Figure 5.** Gène *CYP2A6*.
- Figure 6.** Représentation schématique du gène *CYP2A6*1A* et *CYP2A7*.
- Figure 7.** Représentation schématique du gène *CYP2A6*1B*.
- Figure 8.** Polymorphismes génétiques du *CYP2A6* et risque de cancer des poumons lié au tabac.
- Figure 9 :** Activité enzymatique *CYP2A6* en fonction des groupes ethniques.
- Figure 10.** Métabolisme de l'acide arachidonique.
- Figure 11.** Principaux polymorphismes du gène *CYP1A1*.
- Figure 12.** Mécanismes de l'activation transcriptionnelle par AhR du gène *CYP1A1* et rétrocontrôle négatif de AhR par AhRR.
- Figure 13.** Hypothèse mécanistique de l'activation transcriptionnel du gène *Cyp1a1* chez la souris.
- Figure 14.** Principaux polymorphismes du gène *AHR*.
- Figure 15.** Processus d'athérosclérose via l'inhibition de la transduction signalétique LXR par les hydrocarbures polycycliques.
- Figure 16.** Modèle d'interaction gène-environnement.
- Figure 17 :** Génotypage du *CYP2A6*1B* par RFLP.
- Figure 18:** Stratégie d'identification des polymorphismes *CYP2A6*1A*, *CYP2A6*1B*, *CYP2A6*4A* par RFLP.
- Figure 19 :** Principe de la technique de génotypage des *CYP2A6*1A*, *CYP2A6*1B*, et *CYP2A6*4A*.
- Figure 20 :** Gels de migration des produits de PCR digérés des polymorphismes *CYP2A6*.
- Figure 21 :** Représentation de la technique de « thermocyclage cinétique ».
- Figure 22.** Pressions artérielles systolique et diastolique en fonction du statut tabagique et du polymorphisme *CYP1A1* T3801C.
- Figure 23.** Pression artérielle systolique et diastolique chez l'ancien fumeur et en fonction du polymorphisme *CYP1A1* T3801C.
- Figure 24.** Pressions artérielles systolique et diastolique en fonction du statut tabagique et des polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* G1661A.

Liste des tableaux

- Tableau 1.** Polymorphismes du CYP 2A6.
- Tableau 2.** Variations interethniques et fréquences alléliques des polymorphismes CYP2A6.
- Tableau 3.** Caractéristiques démographiques des sujets génotypés CYP2A6 en fonction du sexe.
- Tableau 4.** Répartition des polymorphismes *CYP2A6* selon le sexe.
- Tableau 5.** Effectif et fréquence (%) des polymorphismes *CYP2A6* en fonction du statut tabagique.
- Tableau 6** Génotypes *CYP2A6* et nombre de cigarettes fumées par jour chez les fumeurs et ex-fumeurs pendant une période de cinq ans.
- Tableau 7.** Caractéristiques démographiques et des sujets génotypés CYP1A1 et AhR en fonction du sexe.
- Tableau 8.** Répartition des polymorphismes *CYP1A1* et *AhR* selon le sexe.
- Tableau 9.** Analyse par régression multiple de la pression artérielle systolique et diastolique en fonction du statut tabagique.
- Tableau 10.** Pression artérielle en fonction des polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* G1661A.

Liste des abréviations

AA	Acide Arachidonique
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
apo	apolipoprotéine
ARNm	Acide ribonucléotidique messenger
ARNT	Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator
COMT	Catéchol-O-méthyl transférase
CV	Coefficient de Variation
CYPs	Cytochromes P450
DA	Dopamine
DAT	Transporteur de la dopamine
DHET	Acide dihydroeicosatétraénoïque
dNTP	désoxynucléotides TriPhosphate
EDHF	Endothelium Hyperpolarizing Factor
EGF	Epithelial Growth Factor
eNOS	NO synthase endothéliale
EETs	acides epoxyeicosatriénoïques
EPA	Acide eicosapentaénoïque
GST	Glutathion S-tranférase
HDL	High Density Lipoprotein
HETEs	Acides hydroxyeicosatétraénoïques
HPETE	Acide hydroxypentaeicosatétraénoïque
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IMC	Indice de Masse Corporelle
IL	Interleukine
kDa	kiloDalton
KO	knock out
KTC	Thermocyclage cinétique
LDL	Low Density Lipoprotein
LT	leucotriène
LXR	Liver X Receptor
MAO	Monoamine oxydase

MR	métaboliseurs rapides
NO	oxide nitrique
NOS	synthase de l'oxyde nitrique
OR	Odd Ratio
PAHs	Hydrocarbures polycycliques aromatiques
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Prostaglandine
PGH2	prostaglandine H2
PGI2	prostaglanine I2
PPAR	Proliferators Peroxisome Activator Receptor
RCV	Risques cardiovasculaires
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RXR	Retinoid X Receptor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TG	Triglycéride
TH	Tyrosine Hydroxylase
TGF-β	transforming growth factor-β
TX	tromboxane
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Liste des Publications

○ *Thèse*

- **Gambier N**, Batt AM, Marie B, Pfister M, Siest G, Visvikis-Siest S.
Association of CYP2A6*1B genetic variant with the amount of smoking in French adults from the Stanislas cohort.
Pharmacogenomics J 2005; 5: 271-5.
- **Gambier N**, Marteau JB, Batt AM, Marie B, Thompson A, Siest G, Foernzler D, Visvikis-Siest S.
Association of CYP1A1 T3801C and AHR A554K polymorphisms with blood pressure in French male ex-smokers from the Stanislas cohort.
Soumis à publication (J Hypertens).
- Marteau JB, **Gambier N**, Jeannesson E, Batt AM, Siest G, Visvikis-Siest S.
From Pharmacogenetics to Pharmacogenomics of antihypertensive drugs.
Soumis à publication (Pharmacogenomics).
- **Gambier N**, Batt AM, Siest G, Visvikis-Siest S.
Smoking-genetic polymorphisms interactions and cardiovascular disease.
En préparation.
- **Gambier N**, Runser N, Ferrari L, Batt AM, Siest G, Visvikis-Siest S.
Aortic, heart and renal Cytochromes P450 in Apolipoprotein E-Deficient Mice.
En préparation.

○ *Autres*

- **Gambier N**, Vigneron J.H, Menetre S, May I, Hofman M.A.
Stability of mercaptopurine in capsules for paediatric patients using a capillary electrophoresis assay.
European Journal of Pharmacy Hospital Science 2006 ; 12 : 13-15.
- Petitpain N, **Gambier N**, Muller JC, Romemont E, Gillet P.
Dysphonia induced by selective serotonin reuptake inhibitors.
South Med J 2005; 98:843.
- Armand C, **Gambier N**, Boltz P, Puskarczyk E, Manel J, Lambert H.
Apport du fichier d'identification des formes orales et solides du centre antipoison de Nancy dans la mise en évidence du détournement d'usage des médicaments.
Alcoologie et Addictologie 2004 ; 26: 227-234.
- Le Boisselier R, Debruyne D, Auclair V, **Gambier N**, Coquerel A.
Anabol (méthandiénone): mise en évidence d'un usage illicite en France.
Thérapie 2004; 59: 555-8.
- Petitpain N, Pouaha J, Cosserat F, **Gambier N**, Truchetet F, Cuny JF.
Recurrent dysphonia and acitretin.
J Voice 2005 (sous presse).
- Petitpain N, Pouaha J, **Gambier N**, Cosserat F, Truchetet F, Cuny JF.
Fever probably induced by local anaesthetics : a propos of two cases.
Soumis à publication (Br J Dermatol).
- Kassem H, **Gambier N**, Ris C, Royer-Morrot MJ, Derelle J, Manel J.
Tabagisme passif et altération de l'hématose chez l'enfant.
En préparation.



Hypothèses de travail et objectifs

Les maladies cardiovasculaires sont des affections multifactorielles, où l'environnement, les habitudes alimentaires et l'hygiène de vie jouent un rôle important en tant que facteurs de risque en plus de la génétique. Si certains facteurs de risque cardiovasculaire ne sont pas modifiables et sont indépendants de l'Homme comme l'âge, le sexe et l'hérédité, d'autres le sont et non des moindres, comme les dyslipidémies, les facteurs nutritionnels, la sédentarité, le diabète, l'hypertension artérielle et le tabagisme.

Si le rôle nocif du tabac sur l'appareil cardiovasculaire est désormais solidement établi par les études épidémiologiques, son ou ses modes d'action sont moins bien connus. Les mécanismes physiopathologiques de la toxicité vasculaire du tabac sont complexes et ne se limitent pas à son rôle athérogène. Les études publiées ont mis en évidence de multiples effets du tabac comme par exemple l'effet toxique direct sur l'endothélium artériel, l'oxydation des LDL et l'effet thrombogène.

Les CYP métabolisent non seulement les toxiques ou les médicaments mais aussi des substrats endogènes. De nombreuses publications ont montré que l'acide arachidonique était métabolisé par les cytochromes P450 en métabolites vaso-actifs. Il semble évident que ces métabolites occupent une position centrale en tant que facteurs paracrines et seconds messagers dans la régulation des fonctions cardiovasculaires. Parmi la vingtaine de P450 présents dans le tractus vasculaire, le CYP1A1 est impliqué dans le risque lié au tabac. Les composants de la fumée de cigarette se révèlent à la fois substrats et inducteurs du CYP1A1. Cette induction est également modulée par le facteur de régulation du CYP1A1, le récepteur AhR, lui-même induit par les composants de la fumée de tabac. Ce CYP1A1 étant polymorphe, il est probable que les différents variants aient des activités métaboliques différentes et que les quantités de métabolites vaso-actifs produits soient variables.

Les données épidémiologiques apportent les preuves indiscutables du bénéfice à attendre de l'arrêt du tabac sur le plan cardiovasculaire. Mais le principal obstacle à l'arrêt du tabagisme est représenté par le fait que c'est une véritable drogue entraînant une dépendance à la fois physique, psychologique ou psycho-comportementale. La nicotine est le principal composé responsable de la dépendance physique. Il est reconnu que le cytochrome P450 2A6 est la voie principale (80%) d'oxydation de la nicotine en cotinine. Des polymorphismes de ce CYP entraînant une activité augmentée ou diminuée pourraient avoir des conséquences sur le

comportement des fumeurs comme la dépendance à la nicotine, la capacité de s'arrêter et le nombre de cigarettes fumées.

Dans cette étude, nous nous proposons d'étudier les polymorphismes de deux cytochromes P450 présents dans la population française et impliqués dans le métabolisme des constituants de la fumée de cigarette. Ce travail s'est engagé sur plusieurs objectifs spécifiques :

- **la détermination de :**
 - **deux polymorphismes de CYP2A6, CYP2A6*1B (activité enzymatique élevée) peu étudié de nos jours et CYP2A6*4A (activité enzymatique réduite),**
 - **un polymorphisme de CYP1A1, CYP1A1*2A ou *MspI* qui génère une protéine fortement inductible par les hydrocarbures et une activité enzymatique augmentée qui est associée à l'augmentation du cancer du poumon chez les fumeurs,**
 - **un polymorphisme du récepteur AhR, l'allèle 1661G>A qui induit une activité CYP1A1 significativement plus élevée que chez les sujets non porteurs de ce polymorphisme,**
- **la mesure des fréquences de ces polymorphismes,**
- **les études de corrélation de chacun de ces polymorphismes CYP2A6 avec la consommation journalière de cigarettes et le statut tabagique,**
- **l'examen des relations éventuelles des polymorphismes CYP1A1 et son facteur de régulation AhR avec certains facteurs de risque cardiovasculaire telle que la pression artérielle.**

Dans ce but, nous avons mené notre étude auprès de sujets sains fumeurs et non fumeurs dans un échantillon issu de la cohorte STANISLAS.

Une étude chez des **sujets sains** permet de comprendre la physiologie des processus et d'apprécier la variabilité d'un phénotype intermédiaire, comme la tension artérielle, dans des conditions physiologiques sans l'influence d'un traitement médicamenteux ou d'une pathologie. En outre, dans une optique prédictive, l'intérêt est de caractériser d'abord les « déviations » physiologiques d'un état donné qui pourrait ensuite aider à comprendre la pathologie.

Situation du Sujet

Le tabagisme constitue l'une des plus graves épidémies de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle et reste un problème mondial de santé publique. D'après Ezzati et Lopez, 2003, le tabac est actuellement responsable de près de 5 millions de décès par an dans le monde. En France, les données les plus récentes indiquent que le tabac est responsable chaque année de 60000 décès. Le tabagisme, reconnu comme la première cause de mortalité évitable, est un facteur de risque dans la survenue des cancers et des pathologies respiratoires qui dépasse très largement le domaine cardiovasculaire (Henningfield *et al.*, 2005 ; Czernin et Waldherr, 2003). L'arrêt ou la diminution de la consommation de tabac est toujours bénéfique pour la santé du fumeur, même après des années de consommation (Stein *et al.*, 2005 ; Godtfredsen *et al.*, 2005). Néanmoins, les individus ne sont pas égaux face au tabagisme, plusieurs facteurs environnementaux et génétiques interfèrent aux différents stades du tabagisme : l'initiation, la persistance, l'arrêt et l'abstinence.

1. Facteurs génétiques et dépendance tabagique

1.1. Consommation de tabac et dépendance

La dépendance au tabac est un problème complexe et multifactoriel, mettant en jeu à la fois des facteurs génétiques et environnementaux. A ce jour, plusieurs études ont été menées afin de mettre en évidence une relation entre certains gènes candidats et la dépendance au tabac (Batra *et al.*, 2003). Hormis les nombreux gènes pouvant être impliqués directement ou indirectement dans la dépendance, comme celui de la variabilité des réponses au stress, aux goûts, aux odeurs ou encore la susceptibilité à l'obésité, deux grandes classes de gènes candidats ont été retenues : les gènes impliqués dans le mécanisme d'action des substances addictives du tabac et les gènes impliqués dans le métabolisme de la nicotine (Anonyme, 2004)

1.1.1. Gènes impliqués dans le mécanisme d'action des substances addictives du tabac

Dans l'état actuel des connaissances, la nicotine apparaît comme le principal constituant expliquant les propriétés addictives du tabac (Cohen, 1988). Plusieurs gènes sont impliqués dans les différents mécanismes d'action de la nicotine (Batra *et al.*, 2003). Ces gènes appartiennent à la famille des récepteurs nicotiniques ou sont associés aux voies dopaminergique, sérotoninergique et adrénergique ou correspondent à des récepteurs opioïdes, cannabinoïdes ou à d'autres neuromédiateurs qui modulent le système de récompense (**Figure 1**).

1.1.1.1. Récepteurs nicotiniques

Le récepteur nicotinique est une protéine transmembranaire pentamérique couplée à un canal ionique. Le récepteur nicotinique neuronal est un pentamère membranaire constitué de deux sous-unités α et β (Gotti et Clementi, 2004). Des différences génétiques dans l'activité des récepteurs nicotiniques et muscariniques présents dans le système nerveux central pourraient participer à la dépendance. L'étude du récepteur nicotinique $\alpha_4\beta_2$ (CHRNA2) a montré une forte affinité pour la nicotine et une majoration de ses effets (Liang *et al.*, 2005 ; Cohen *et al.*, 2003). Les polymorphismes du gène codant la sous unité β_2 pourraient également être impliqués dans la dépendance au tabac, bien que les études portant sur l'initiation et la dépendance à la nicotine ne montrent pas de résultat significatif (Silverman *et al.*, 2000). D'autres sous-unités composant les récepteurs nicotiniques, notamment la sous unité α_6 (CHRNA6), pourraient être impliquées dans la dépendance au tabac et représenter des cibles futures à explorer, comme le montrent des études chez la souris (Tritto *et al.*, 2002). Néanmoins, seule la sous-unité α_4 du récepteur nicotinique serait impliquée dans les mécanismes de dépendance à la nicotine (Li *et al.*, 2005).

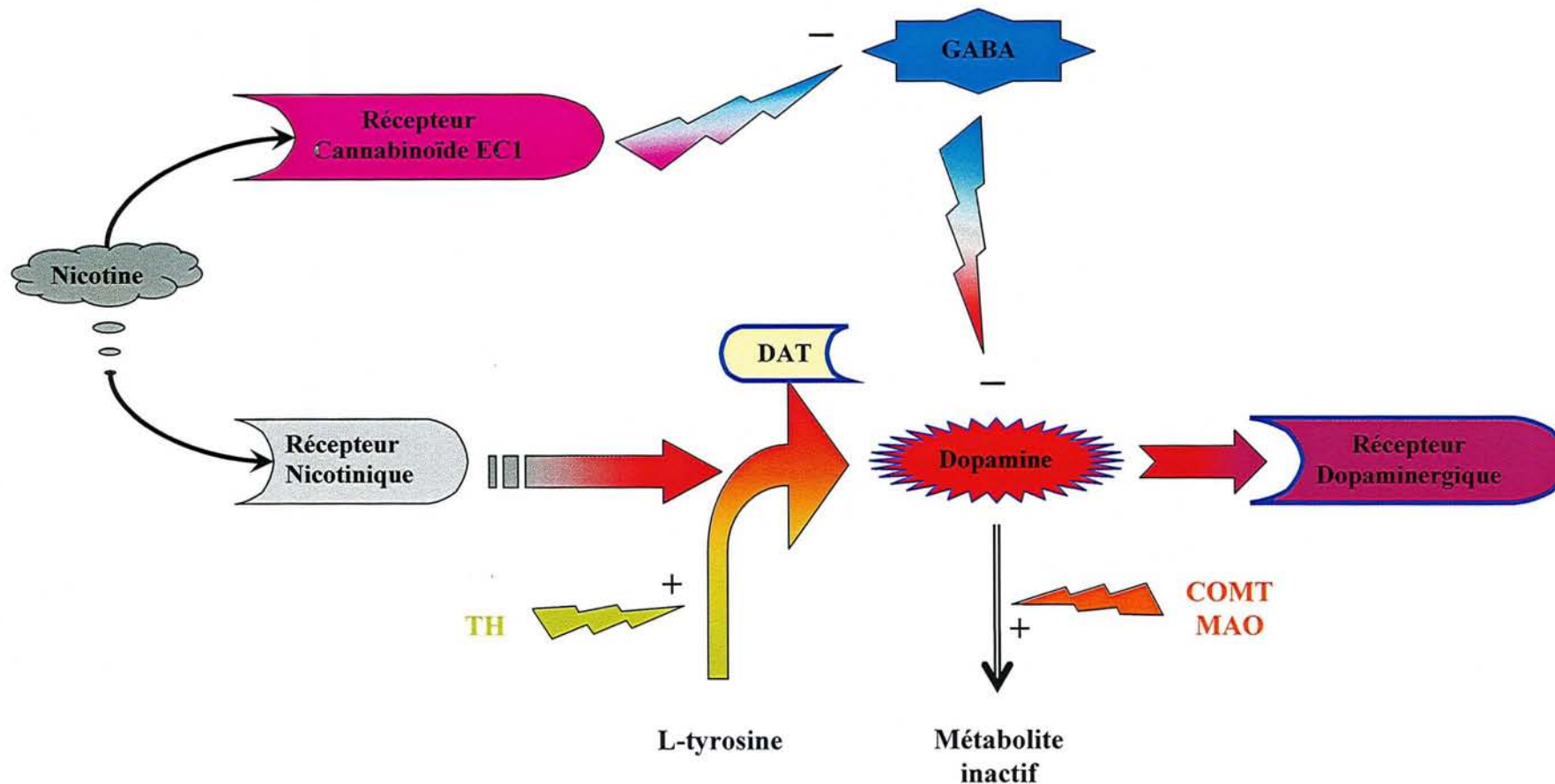


Figure 1. Effets de la nicotine sur la neurotransmission de la dopamine d'après Cohen *et al.*, (2005) et Batra *et al.*, (2003). La nicotine augmente la libération de dopamine (DA). La Tyrosine Hydroxylase (TH) transforme la tyrosine en L-dopa, précurseur de la dopamine et étape limitante de sa synthèse. Le transporteur de la dopamine (DAT) est un site de recapture de la dopamine, il régule son taux dans la fente synaptique. Les enzymes COMT (catéchol-O-méthyl transférase) et MAO (monoamine oxydase) sont impliquées dans le métabolisme de la dopamine. La dopamine se fixe sur les récepteurs postsynaptiques et régule la neurotransmission. La nicotine accentue la libération de dopamine via l'inhibition des récepteurs cannabinoïdes et des récepteurs GABA. + : activation ; - : inhibition.

1.1.1.2. Voie dopaminergique

Parallèlement aux gènes des récepteurs nicotiniques, la dépendance tabagique serait liée aux polymorphismes des gènes de la voie dopaminergique (Batra *et al.*, 2003). La nicotine stimule la sécrétion de dopamine au niveau du *nucleus accumbens*, probablement par l'intermédiaire des récepteurs à l'acétylcholine, agit sur le comportement et sur les phénomènes de dépendance (Wise, 1998 ; Boustead *et al.*, 1997).

1.1.1.2.1. Gènes des récepteurs à la dopamine

La dopamine agit par l'intermédiaire de cinq récepteurs répartis en deux sous-familles, les récepteurs de type D1 (sous-types D1 et D5) qui stimulent l'activité de l'adényl cyclase par l'intermédiaire des protéines G et les récepteurs de type D2 (sous-types D2, D3, D4) négativement couplés à cette enzyme. Les polymorphismes des gènes codant pour les récepteurs à la dopamine ont été identifiés et étudiés dans les pathologies addictives (Lerman *et al.*, 2005 ; Batra *et al.*, 2003). Seuls les gènes des récepteurs à la dopamine D1, D2, et D4 seraient associés au tabagisme (Arinami *et al.*, 2000). Une étude d'association a retrouvé un lien entre l'homozygotie de l'allèle Ddel du récepteur D1 et le nombre de cigarettes consommées (Comings *et al.*, 1997). Concernant la dépendance au tabac, il semblerait que les individus possédant l'allèle *DRD2*A1* aient moins de récepteurs à la dopamine et une plus faible affinité pour ce ligand (Thompson *et al.*, 1997), obligeant ces individus à fumer plus pour obtenir des concentrations de nicotine suffisantes et provoquer une libération suffisante de dopamine. Néanmoins, aucune étude n'a mis en évidence la relation entre ce polymorphisme et la dépendance à la nicotine (Batra *et al.*, 2003).

Le récepteur D4 de la dopamine (DRD4) présente de nombreux polymorphismes. L'allèle L, le plus étudié, pourrait réduire l'affinité pour la dopamine. Une interaction significative entre ce polymorphisme, la dépression et le tabagisme a été décrite (Lerman *et al.*, 1998).

1.1.1.2.2. Gène transporteur de la dopamine

La protéine transporteur de la dopamine est exprimée par le gène *SLCA3*. Les modifications de ce gène influenceraient les concentrations de dopamine ainsi que les réponses de celles-ci au niveau synaptique.

L'allèle *SLC6A3-9* est associé à des excès de dopamine. Il semblerait que les fumeurs possédant cet allèle, aient fumé à un âge supérieur à 16 ans et que la durée de sevrage soit plus courte. Ces observations suggèrent que l'augmentation de dopamine dans l'espace synaptique est un facteur protecteur contre la dépendance tabagique, ceci se vérifiant encore plus en présence de l'allèle *DRD2-A2* (Batra *et al.*, 2003).

1.1.1.2.3. Gènes impliqués dans la synthèse et le métabolisme de neurotransmetteurs (dopamine et noradrénaline)

Plusieurs enzymes telles que la tyrosine hydroxylase (TH), la dopamine β -hydroxylase (DBH), la catéchol-O-méthyl transférase (COMT), la DOPA décarboxylase et les monoamine oxydases (MAO)-A et (MAO)-B sont impliquées dans la synthèse et le métabolisme de la dopamine. Surtout étudiées dans les pathologies liées à l'alcoolisme, aux dépressions et aux schizophrénies, ces enzymes ont fait l'objet de peu d'études avec le tabac (Ma *et al.*, 2005 ; Batra *et al.*, 2003).

La TH est l'enzyme limitante qui permet l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-DOPA. Le gène humain de la TH présente plusieurs polymorphismes dont une répétition variable dans le premier intron (TCAT)_n qui pourrait modifier la concentration d'un métabolite de la dopamine dans le liquide céphalorachidien (Jonsson *et al.*, 1996) ; toutefois, aucune association n'a été retrouvée avec le tabagisme (Lerman *et al.*, 1996). La DBH catalyse la conversion de la dopamine en noradrénaline dans les cellules noradrénergiques. Des taux diminués sont associés à la dépendance aux drogues (Gabel *et al.*, 1995). Une étude a montré que les fumeurs homozygotes pour l'allèle G du polymorphisme *DBH A1368G* consommaient moins de cigarettes et que cet effet était particulièrement marqué pour les femmes et pour les Caucasiens (McKinney *et al.*, 2000). Un polymorphisme fonctionnel biallélique commun présent dans le gène de la COMT, A1947G ayant pour conséquence une différence d'activité enzymatique entre les deux variants. Ce polymorphisme n'est pas associé à l'initiation, la persistance ou l'arrêt du tabac (David *et al.*, 2002). L'exposition au tabac semble diminuer les taux de MAO-A et MAO-B dans le cerveau et il existerait une relation modeste entre un polymorphisme du gène MAO-B et le tabac (Batra *et al.*, 2003).

1.1.1.3. Voie sérotoninergique

Il semblerait que la nicotine augmente la libération de sérotonine dans le cerveau et que les symptômes du sevrage nicotinique soient modulés par une diminution de la neurotransmission sérotoninergique (Reuter *et al.*, 2005 ; Ribeiro *et al.*, 1993). Deux polymorphismes du gène *SLC6A4* du transporteur de la sérotonine sont décrits, l'allèle S qui induit une diminution de l'activité de transcription par rapport à l'allèle L (Heils *et al.*, 1996). Il existe une relation entre les polymorphismes du gène transporteur de la sérotonine (5-HTT) et le sevrage tabagique, la dépendance nicotinique et l'attitude tabagique (Gerra *et al.*, 2005 ; Lerman *et al.*, 2000). De plus, les variations de ce gène impliqué dans le transport de la sérotonine, affecteraient l'agrégation des plaquettes, facteur de risque dans les pathologies cardiovasculaires (Lesch *et al.*, 1994).

1.1.1.4. Récepteurs cannabinoïdes

La nicotine présente une forte affinité pour les récepteurs cannabinoïdes de type CB1 localisés dans les tissus périphériques et au niveau du système nerveux central, plus particulièrement au niveau des zones émotionnelle et locomotrice (Cohen *et al.*, 2005). L'activation de ces récepteurs cannabinoïdes diminuerait la motricité et le seuil nociceptif, et augmenterait l'hypothermie et les effets anxiolytiques via la voie dopaminergique mésolimbique et mésocorticale (Castané *et al.*, 2005). L'existence de polymorphismes des récepteurs cannabinoïdes pourrait participer aux éventuelles variations interindividuelles vis-à-vis du tabagisme (Gadzicki *et al.*, 2004).

1.1.1.5. Récepteurs opiacés

La récompense nicotinique passerait via la voie des récepteurs opiacés μ et du facteur de transcription nucléaire CREB (cAMP responsive element binding protein) impliqué dans la mémorisation à long terme. Le gène des récepteurs opiacés μ posséderait au niveau de son promoteur un élément de réponse à l'AMPc (site CRE) permettant de réguler sa transcription. Une prise régulière de nicotine interagirait avec le gène CREB et diminuerait la synthèse des récepteurs opiacés μ (Walters *et al.*, 2005 ; Josselyn et Ngyen, 2005). Le polymorphisme A118G semble être un facteur de risque modéré pour la dépendance aux drogues, sans être spécifique d'une substance particulière (Schinka *et al.*, 2002).

D'autres gènes peu étudiés dans la dépendance à la nicotine, notamment ceux des récepteurs au GABA, tel le GABAB2 (human gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2) (Beuten *et al.*, 2005), la phosphatase 2B et la protéine kinase C intervenant dans la désensibilisation du récepteur D1 (Marszalec *et al.*, 2005) et le gène *C-Fos* (Cohen *et al.*, 2005), seraient impliqués dans les mécanismes physiologiques de la dépendance à la nicotine.

1.1.2. Gènes impliqués dans le métabolisme de la nicotine

Découverte à la fin du 18ème siècle, la nicotine a été isolée pour la première fois sous forme pure par Posselt et Reimann en 1828. La nicotine est le principal alcaloïde du tabac, représentant 90 à 95% du contenu total en alcaloïdes, elle est plus concentrée dans les feuilles du sommet de la plante que dans les feuilles basses (Le Houezec, 1998).

La nicotine, 1-méthyl-2-(3-pyridyl pyrrolidine, est une amine tertiaire composée d'un cycle pyridinique et d'un cycle pyrrolidinique. Dans les conditions de pression atmosphérique normale, le point de fusion de la nicotine est à 246°C, elle se volatilise donc dans le cône de combustion de tabac (800°C). La forme active de la nicotine est un ion positif dont la charge se situe sur l'azote du cycle pyrrolidinique (Zevin *et al.*, 1998 ; Messina *et al.*, 1997).

1.1.2.1. Métabolisme de la nicotine

Les propriétés pharmacologiques de la nicotine sont importantes à considérer lorsque l'on aborde le problème des mécanismes de dépendance au tabac. L'absorption de la nicotine a lieu tout d'abord au niveau buccal (surtout chez les fumeurs de cigares) puis au niveau des alvéoles pulmonaires (Benowitz, 1988). Les propriétés amphiphiles de la nicotine (qui lui confèrent une certaine affinité pour des milieux différents) favorisent son passage, dépendant du pH, au travers des membranes (Zevin *et al.*, 1998). Après absorption par le système porte, la nicotine subit un métabolisme hépatique présystémique, de sorte que sa biodisponibilité est relativement faible (30-40%). L'inhalation est donc nécessaire pour permettre à la nicotine d'être absorbée par la grande surface de l'épithélium alvéolaire. Ainsi, la nicotine absorbée dans la fumée de tabac évite l'effet de premier passage hépatique et atteint le cerveau plus rapidement qu'après une injection intraveineuse (Tutka *et al.*, 2005).

Avec une demi-vie d'élimination d'environ 2 heures et une grande variabilité interindividuelle (1 à 4 heures) (Hukkanen *et al.*, 2005), la nicotine est métabolisée chez l'homme principalement dans le foie, mais aussi un peu au niveau des poumons, des reins et du

cerveau, notamment au niveau du striatum (Miksys *et al.*, 2004 ; Le Houezec, 1998). 80 % de la nicotine sont métabolisés par le cytochrome P450 2A6 en ion nicotine $\Delta^{1'(5')}$ -iminium. Celui-ci est ensuite métabolisé par une aldéhyde oxydase cytosolique en un métabolite inactif, la cotinine (Benowitz *et al.*, 1994). Néanmoins, la nicotine est aussi métabolisée par des monooxygénases à flavine en nicotine N'-oxydée. Le CYP2B6 et CYP2D6 participeraient, mais de façon mineure chez les sujets porteurs de l'enzyme CYP2A6 active, à l'inactivation de la nicotine en cotinine (Yamanaka *et al.*, 2005a ; Yamazaki *et al.*, 1999).

La cotinine dont la demi-vie fluctue entre 16 et 22 heures, est ensuite métabolisée par ce même CYP2A6 en plusieurs métabolites secondaires, dont la trans-3'-hydroxycotinine qui est majoritaire dans les urines (40%), l'isomère cis-3'-hydroxycotinine représente moins de 0.3% (Oscarson, 2001). D'autres voies métaboliques interviennent pour donner naissance à plusieurs métabolites comme la 5'-hydroxycotinine, la cotinine N'-oxydée et la norcotinine, soit environ 5% de l'élimination urinaire de la nicotine (**Figure 2**). La nicotine, la cotinine et la trans-3'-hydroxycotinine peuvent être éliminées sous forme glucuronoconjugée (**Figure 3**) (Yamanaka *et al.*, 2005b; Nakajima et YOKOI, 2005 ; Murphy *et al.*, 1999).

Chez l'homme, la normicotine est un métabolite actif issu de la nicotine via la voie des CYP2A6 et CYP2B6. Sa synthèse hépatique est négligeable alors qu'au niveau cérébral, la normicotine serait synthétisée « in situ » et atteindrait des concentrations aussi importantes que celle de la nicotine (Yamanaka *et al.*, 2005b). Chez le fumeur, la concentration de CYP2B6 dans le cerveau est plus importante que chez le non fumeur, suggérant une induction de ce cytochrome par la nicotine (Miksys *et al.*, 2003).

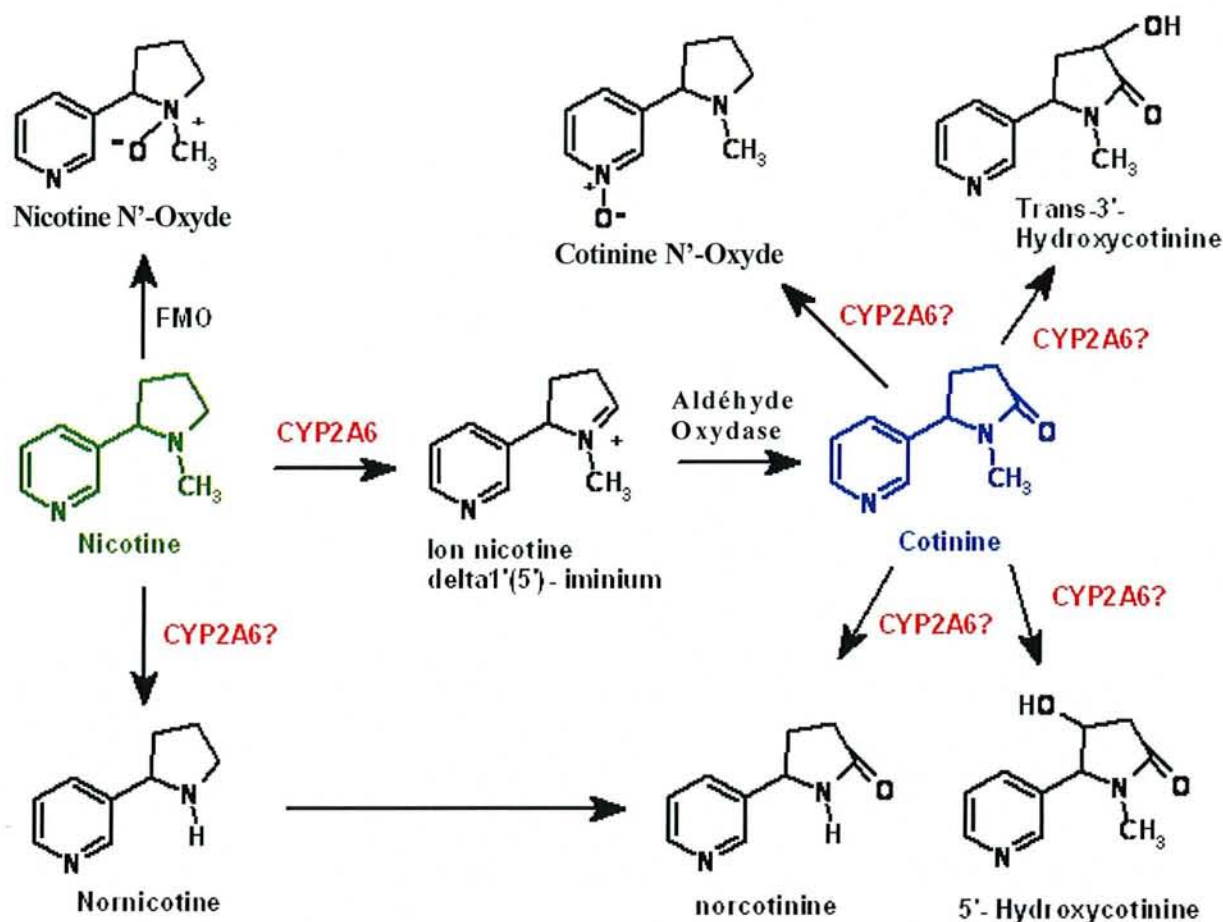


Figure 2. Principales voies de métabolisation de la nicotine chez l'homme, d'après Tutka *et al.*, (2005).

1.1.2.2. Régulation des P450 impliqués dans le métabolisme de la nicotine

1.1.2.2.1. Régulation de CYP2B6

Au niveau cérébral, le CYP2B6 métabolise la nicotine en un métabolite actif, la norcotinine (Yamanaka *et al.*, 2005a). A l'heure actuelle, plus de 20 polymorphismes sont décrits pour le gène CYP2B6 avec pour conséquence des modifications de l'activité enzymatique (Zukunft *et al.*, 2005 ; Hiratsuka *et al.*, 2004). Néanmoins, à notre connaissance, aucune donnée de la littérature ne mentionne à ce jour un lien entre polymorphisme CYP2B6 et dépendance tabagique.

La régulation des CYP2B6 se ferait via la voie des récepteurs nucléaires, notamment les récepteurs répondant au phénobarbital et aux composés dits « *phenobarbital like* » (CAR) et la voie des récepteurs répondant aux pregnanes (PXR) (Lamba *et al.*, 2004 ; Lamba *et al.*, 2003).

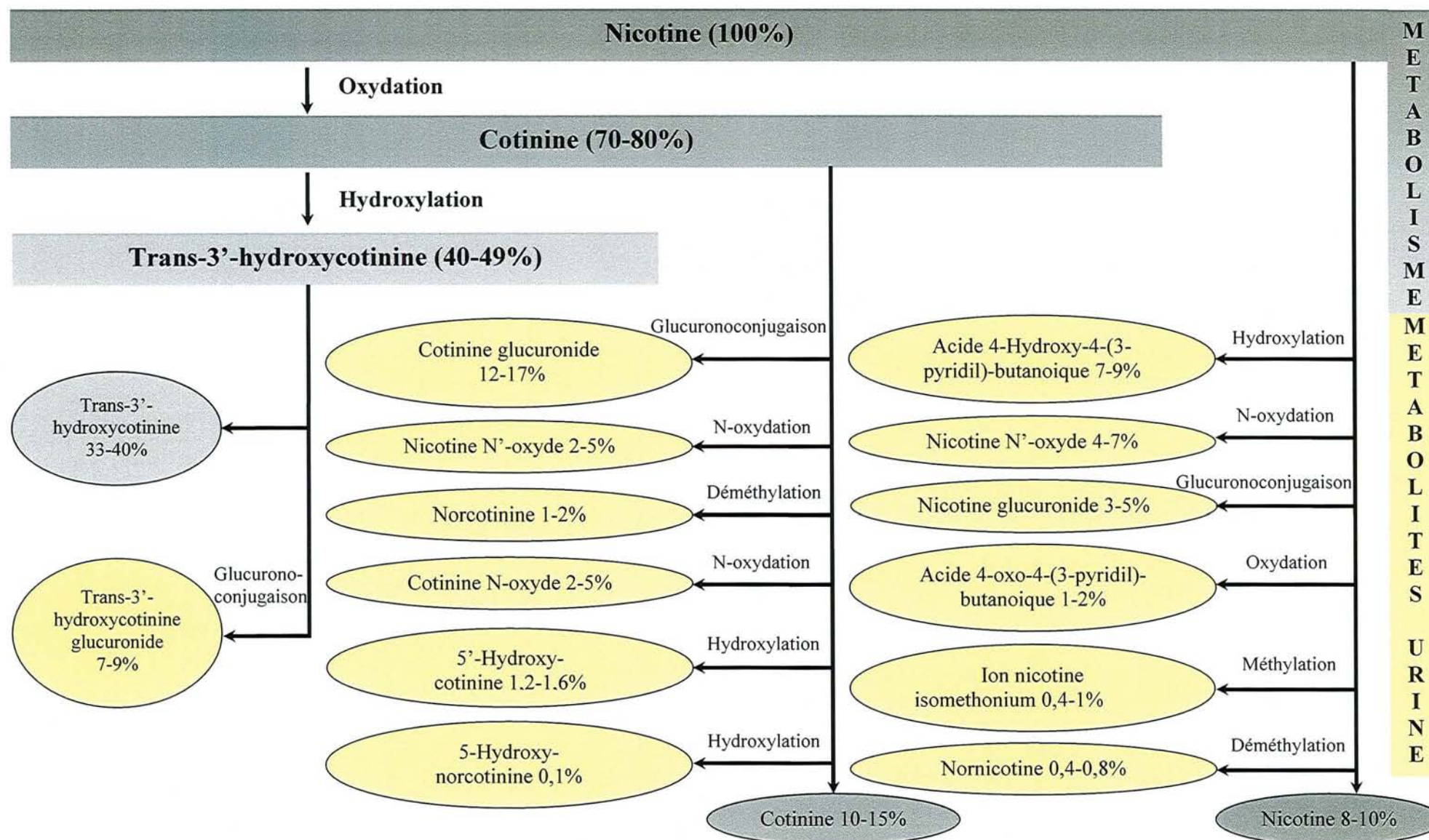


Figure 3. Quantification des métabolites de la nicotine chez l'homme d'après Hukkanen *et al*, (2005) et Berny *et al*, (2002).

1.1.2.2.2. Régulation de CYP2A6

La régulation transcriptionnelle du CYP2A6 n'est pas encore parfaitement connue et semble complexe. Le récepteur nucléaire CAR (Constitutif Androstane Receptor) participerait à l'induction de CYP2A6 contrairement au récepteur PXR (Pregnane X Receptor) (Maglich *et al.*, 2004), même si ce dernier est activé par la nicotine (Lamba *et al.*, 2004).

Plusieurs facteurs transcriptionnels interviendraient dans la régulation du CYP2A6, notamment les facteurs de transcriptions HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor-4), C/EBP α (CCAATT-box/enhancer binding protein) et Oct-1 (octamer transcription factor-1) exerçant un effet inducteur et C/EBP β qui une fois surexprimé, tend à diminuer l'activité promotrice de CYP2A6 (Pitarque *et al.*, 2005). D'autres facteurs transcriptionnels positifs comme le NF-Y (Nuclear Factor Y) qui sous sa forme hétérotrimérique (NF-YA, B, C) vient se fixer au niveau de la CCAAT box dans la région flanquante 5' (entre -932 et -606) (Von Richter *et al.*, 2004) (**Figure 4**).

Les nombreuses différences interindividuelles observées pour l'ARNm du CYP2A6 suggèrent que les variations génétiques au niveau de la région promotrice du CYP2A6 affectent la transcription ou influencent la stabilité de l'ARNm dans la région flanquante 3' (Pitarque *et al.*, 2005). En effet, certaines protéines présentes dans les hépatocytes humains, comme l'hRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1), interagissent au niveau de la région non traduite 3' de l'ARNm de CYP2A6 et stabilisent celui-ci (Christian *et al.*, 2004).

Le métabolisme de la nicotine présente une variabilité interespèces et interindividuelle importante. Les sujets « métaboliseurs lents » fument moins, font moins de cancers du poumon et s'arrêtent de fumer plus facilement. Malgré une littérature abondante sur le sujet et en raison d'importantes variations interespèces dans la fréquence des allèles délétés ou dupliqués (asiatiques *versus* caucasiens), le rôle protecteur de l'inactivité du CYP2A6 restent controversés (Tutka *et al.*, 2005 ; Hukkanen *et al.*, 2005 ; Malaiyandi *et al.*, 2005).

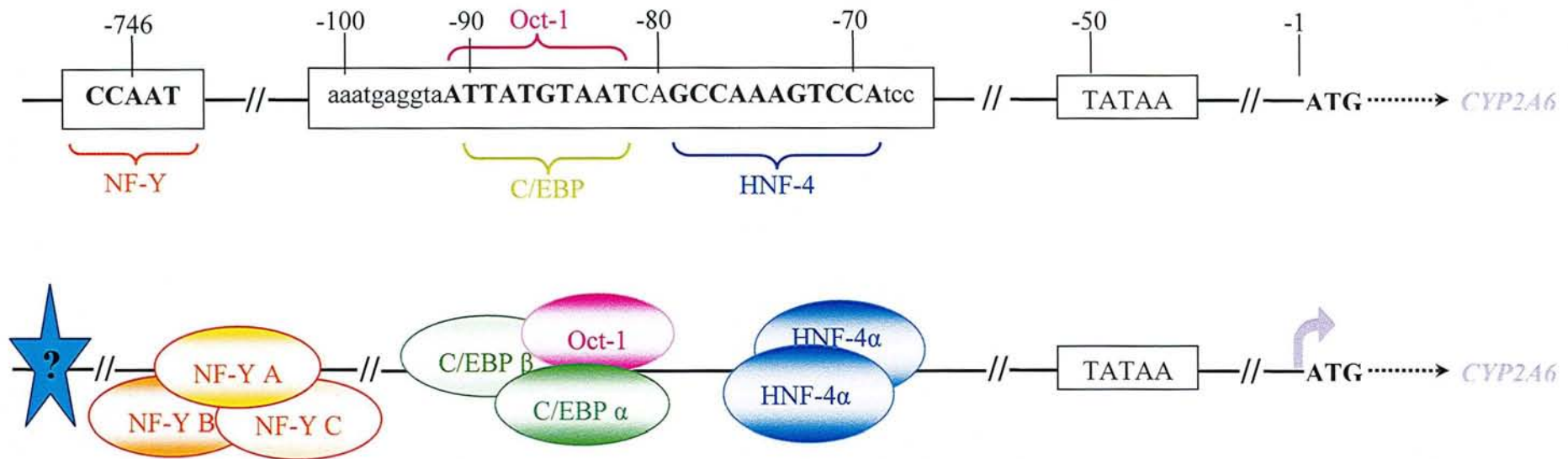


Figure 4. Régulation transcriptionnelle du gène *CYP2A6*, d'après Pitarque *et al*, (2005) et Von Richter *et al*, (2004). La figure illustre les éléments et les facteurs transcriptionnels impliqués dans la régulation de ce gène. La régulation transcriptionnelle du gène se ferait via les différents dimères C/EBP et trimères NF-Y fixés sur leur élément de réponse à -92/-82 et -748 respectivement. L'isoforme C/EBP α active la transcription alors que C/EBP β la réprime. L'hétérotrimère NF-Y A, B et C semble activer la transcription. « ? » suppose d'autres facteurs transcriptionnels situés en amont du gène. La TATA box polymorphe, présente dans l'allèle *CYP2A6**9, constitue un autre facteur génétique important pour la variabilité d'expression du gène *CYP2A6*

2. Génétique du cytochrome P450 2A6

Découvert à la fin des années 80, le CYP2A6 fut nommé dans un premier temps CYP2A3. Le clonage a permis de révéler que ce gène codait pour la protéine IIA3, l'enzyme responsable de la 7-hydroxylation de la coumarine (Pelkonen *et al.*, 2000 ; Yamano *et al.*, 1990).

2.1. Cytochrome P450 2A6

Le CYP2A6 est une protéine de 56kDa constituée de 494 acides aminés (Genatlas, 2005). Principalement exprimé dans le foie chez les humains, le CYP2A6 est aussi présent, mais à des taux plus faibles, dans la muqueuse nasale, dans les cellules épithéliales bronchiques, le colon, les seins, les reins, le cerveau et le placenta. Ce CYP2A a été détecté dans la muqueuse nasale d'animaux à des concentrations importantes, expliquant alors peut-être la participation de ce CYP aux signaux olfactifs. De plus, les CYP2A6 et CYP2A13 ont été mis en évidence dans la muqueuse olfactive de fœtus humains (Yamanaka *et al.*, 2005b ; Rautio *et al.*, 2001).

Thum et Borlak (2000) n'ont pas observé de CYP2A6 dans le tissu cardiaque humain, mais si les tissus cardiovasculaires humains ne paraissent pas exprimer CYP2A, nous avons nous-même observé la présence de CYP2A4/5 et CYP2A12 dans les artères aortes abdominales de souris (Gambier *et al.*, en préparation). Le CYP2A6 n'est pas présent dans le duodénum, les poumons, les macrophages alvéolaires, les lymphocytes périphériques, le placenta et l'endomètre utérin (Koskela *et al.*, 1999).

Le CYP2A6 participe au métabolisme de plusieurs xénobiotiques parmi lesquels des médicaments et des toxiques. Même si l'implication du CYP2A6 dans le métabolisme des médicaments est bien moindre que celui du CYP3A4, il n'est pas pour autant moins important. Le CYP2A6 métabolise majoritairement ou partiellement certains médicaments, notamment la nicotine et son métabolite la cotinine, la 7-hydroxylation de la coumarine, l'halothane, l'acide valproïque, le paracétamol, l'ifosfamide, le cyclophosphamide, le létrozole, le disulfiram et le tegafur, prodrogue du 5-fluorouracile. Le CYP2A6 est aussi impliqué dans l'activation d'un grand nombre de substances pro-carcinogènes, comme l'aflatoxine B1, le 1,3-butadione, le 2,6-dichlorobenzonitrile et plusieurs nitrosamines (NNK : 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridil)-1-butanone ; NDEA : N-nitrosodiethylamine ; NNAM : methyl-n-amyl-nitrosamine) présentes dans la fumée de cigarette (Lewis *et al.*, 2003 ; Rautio, 2003 ; Cok *et al.*, 2001).

2.2. Gène *CYP2A6*

Les gènes des sous-familles *CYP2A*, *CYP2B*, *CYP2F*, *CYP2G*, *CYP2S* et *CYP2T* sont localisés sur le bras long du chromosome 19 (entre 19q12 et 19q13.2) et forment un cluster de gènes d'environ 350Kb. En particulier, la sous-famille *CYP2A* est constituée de 4 membres : les gènes *CYP2A6*, *CYP2A7* et *CYP2A13* et *CYP2A18P* (Pitarque *et al.*, 2005 ; Rautio *et al.*, 2001).

Ces six sous familles descendent probablement du même gène ancestral et se sont différenciés au cours de leur évolution en se spécialisant dans le métabolisme de certains substrats typiques (Nelson, 2003).

Le gène *CYP2A7* est localisé juste à côté du gène *CYP2A6*. Les gènes *CYP2A6* et *CYP2A7* ont 96% d'homologie dans la séquence nucléotidique et 94% dans la séquence d'acides aminés. La structure des gènes de la sous-famille *CYP2A* est constituée de 9 exons et 8 introns, et la taille du gène est d'environ 6Kb (Yamano *et al.*, 1990 ; Miles *et al.*, 1989).

Appelé auparavant *CYP2A3*, le gène *CYP2A6* code une protéine fonctionnelle (Raunio *et al.*, 1999). Le gène *CYP2A7* code une protéine inactive vis à vis de la coumarine et aucun substrat n'a été identifié (Hoffman *et al.*, 2001 ; Ding *et al.*, 1995 ; Yamano *et al.*, 1990). Le *CYP2A13* synthétise une protéine active au niveau de la muqueuse nasale, du foie et de l'appareil respiratoire et est en mesure de métaboliser des nitrosamines contenues dans la fumée de cigarette (Su *et al.*, 2000).

Le gène *CYP2A6* est constitué d'environ 6900 paires de bases et de 9 exons (**Figure 5**) et l'ARNm de 1751 paires de bases (Genatlas, 2005).

Mis à part les facteurs non génétiques, notamment les infections hépatiques virales, les cirrhoses, les parasitoses (Heidbreder *et al.*, 2005 ; Pasanen *et al.*, 1997), les xénobiotiques inducteurs et inhibiteurs (Meunier *et al.*, 2000 ; Draper *et al.*, 1997), une part importante de la variabilité métabolique de *CYP2A6* est expliquée le plus souvent par les polymorphismes génétiques du *CYP2A6* (Hukkanen *et al.*, 2005).

Chromosome Humain 19

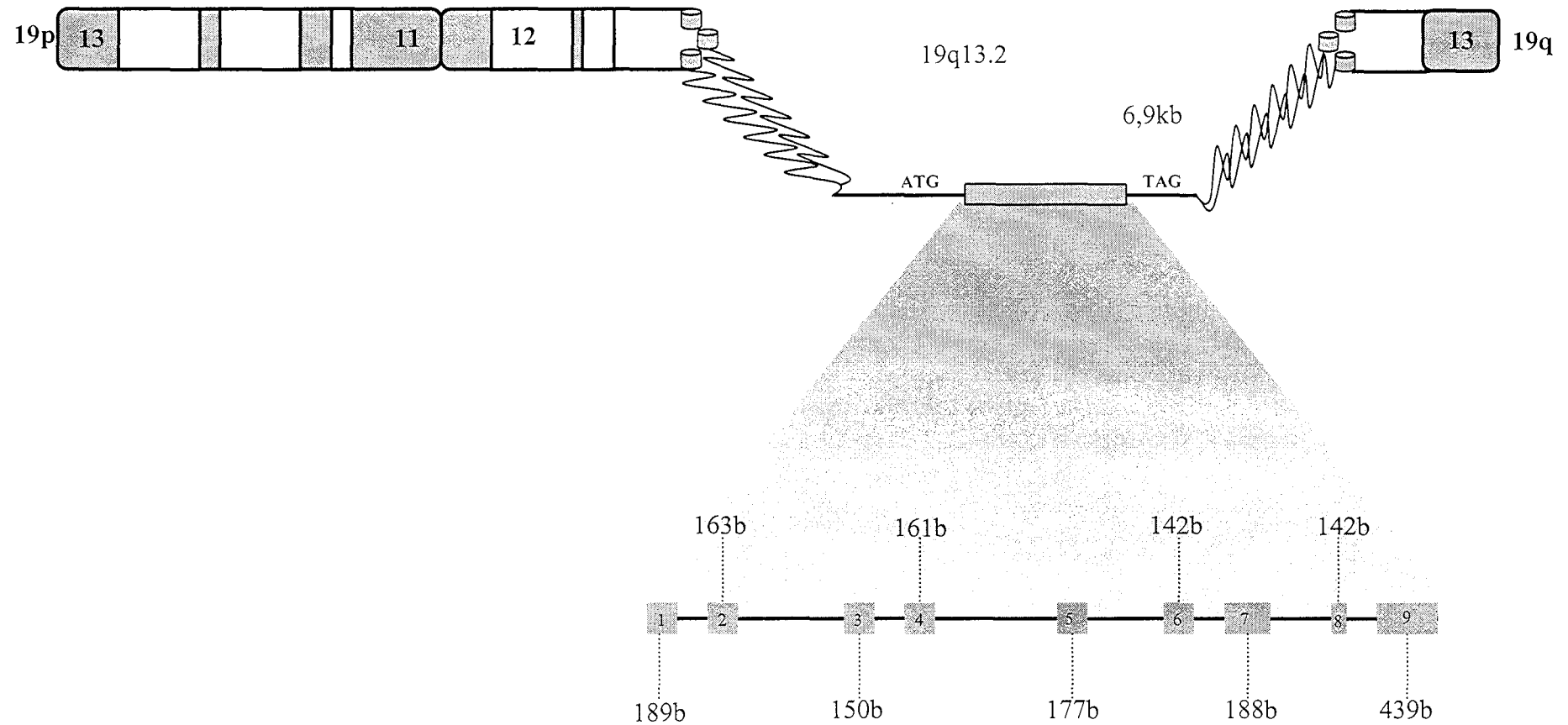


Figure 5. Gène *CYP2A6* d'après Genatlas (2005). Les exons sont symbolisés par des rectangles ou carrés gris. b: au nombre de bases.

2.3. Polymorphismes CYP2A6

Les premières études suggérant le caractère polymorphique du *CYP2A6* ont été obtenues en 1974 à partir d'expériences *in vivo* sur des modèles murins, la réponse à l'induction par le phénobarbital était différente selon l'espèce (Wood *et al.*, 1974). Chez l'homme, les variations interindividuelles de l'activité spécifique du *CYP2A6* ont été rapportées pour la première fois en 1976, lorsque Kratz a observé, à quatre reprises, des fluctuations de l'activité enzymatique dans des microsomes hépatiques de biopsies humaines, la notion de prise de médicaments étant exclue (Kratz, 1976). Ces différences interindividuelles, au niveau de l'expression enzymatique, furent plus tard observées par d'autres auteurs (Pelkonen *et al.*, 1985).

En 1995, Fernandez-Salguero a identifié 3 allèles *CYP2A6* différents, l'allèle sauvage ou fonctionnel *CYP2A6*, un premier variant avec une mutation d'une seule base (T→A) conduisant au remplacement d'une leucine par une histidine au niveau de l'exon 3 et un deuxième variant issu d'une conversion génique avec le *CYP2A7* au niveau des exons 3, 6 et 8 (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995).

A ce jour, une quarantaine de polymorphismes sont décrits pour le *CYP2A6* (<http://www.imm.ki.se/CyPalleles/cyp2a6>); avec des variations interindividuelles et inter-ethniques considérables de l'activité *in vivo* et *in vitro* de ce gène (Hukkanen *et al.*, 2005 ; Oscarson, 2001).

Le tableau 1 présente les différents polymorphismes du *CYP2A6* ainsi que les conséquences fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* sur la protéine. La plupart des allèles possèdent une ou plusieurs substitutions nucléotidiques (ex : *CYP2A6*2*, *CYP2A6*5* et *CYP2A6*7*) alors que d'autres allèles sont des produits issus d'un crossing over avec le *CYP2A7* (ex : *CYP2A6*1B*, *CYP2A6*1X2*, *CYP2A6*4* et *CYP2A6*12*).

Tableau 1: Polymorphismes du CYP 2A6. Activité ↑ augmentée ; ↔ non modifiée ;
↓ diminuée

Allèles	Modification nucléotidique et structurale	Activité enzymatique		Références
		<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	
<i>CYP2A6*1A</i>	Aucune	?	?	Yamano <i>et al.</i> , 1990
<i>CYP2A6*1B1</i> (<i>CYP2A6*1B</i> , <i>CYP2A6*1E</i>)	Conversion génique dans la région 3' flanquante	??		Yamano <i>et al.</i> , 1990 Nakajima <i>et al.</i> , 2001 Pitarque <i>et al.</i> , 2004 Oscarson <i>et al.</i> , 1999b
<i>CYP2A6*1B2</i> (<i>CYP2A6*1B</i>)	-1013A>G; Conversion génique dans la région 3' flanquante			Ariyoshi <i>et al.</i> , 2000 Pitarque <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP2A6*1B3</i> (<i>CYP2A6*1C</i>) <i>CYP2A6*1B4</i>	-395G>A; Conversion génique dans la région 3' flanquante			Kiyotani <i>et al.</i> , 2002 To be released
<i>CYP2A6*1B5</i>	-1680A>G; -1579T>C; -1301A>C; -1289G>A; -1013A>G; 1620T>C; Conversion génique dans la région 3' flanquante			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*1B6</i>	-1680A>G; -1579T>C; -1301A>C; -1289G>A; -1013A>G; 1620T>C; 6285A>G; 6293T>C; Conversion génique dans la région 3' flanquante			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*1B7</i>	-1680A>G; -1579T>C; -1464A>T; -1301A>C; -1289G>A; 1620T>C; Conversion génique dans la région flanquante 3'			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*1B8</i>	-1680A>G; -1579T>C; -1464A>T; -1301A>C; -1289G>A; -1013A>G; 1620T>C; Conversion génique dans la région 3' flanquante			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*1B9</i>	-1680A>G; -1579T>C; -1464A>T; -1301A>C; -1289G>A; -1013A>G; 1620T>C; 6390C>G; Conversion génique dans la région 3' flanquante			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*1B10</i>	-1680A>G; -1579T>C; -1464A>T; -1301A>C; -1289G>A; -1013A>G; 1620T>C; 6389C>G; Conversion génique dans la région 3' flanquante			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*1B11</i>	-1680A>G; -1579T>C; -1464A>T; -1301A>C; -1289G>A; -1013A>G; 1620T>C; 5628C>T; Conversion génique dans la région 3' flanquante			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*1B12</i> <i>CYP2A6*1C</i> <i>CYP2A6*1D</i> <i>CYP2A6*1E</i> <i>CYP2A6*1F</i> <i>CYP2A6*1G</i> <i>CYP2A6*1H</i> <i>CYP2A6*1J</i>	51G>A; Conversion génique dans la région 3' flanquante Voir <i>CYP2A6*1B3</i> -1013A>G Voir <i>CYP2A6*1B1</i> 5717C>T 5717C>T; 5825A>G -745A>G -1013A>G; -745A>G			Haberl <i>et al.</i> , 2005 Pitarque <i>et al.</i> , 2004 Nakajima <i>et al.</i> , 2004 Nakajima <i>et al.</i> , 2004 Von Richter <i>et al.</i> , 2004 Von Richter <i>et al.</i> , 2004 Rao <i>et al.</i> , 2000
<i>CYP2A6*1X2</i>	Duplication du gène	?		Benowitz <i>et al.</i> , 2002 Yamano <i>et al.</i> , 1990
<i>CYP2A6*2</i>	51G>A; 1799T>A (L160H)	Aucune	Aucune	Hadidi <i>et al.</i> , 1997 Oscarson <i>et al.</i> , 1998
<i>CYP2A6*3</i>	hybride <i>CYP2A6/CYP2A7</i>	?	?	Fernandez-Salguero <i>et al.</i> , 1995 Oscarson <i>et al.</i> , 1999a
<i>CYP2A6*4A</i>	Absence <i>CYP2A6</i>	Aucune		Nunoya <i>et al.</i> , 1999a Nunoya <i>et al.</i> , 1999b Ariyoshi <i>et al.</i> , 2000 Nunoya <i>et al.</i> , 1998
<i>CYP2A6*4B</i>	Absence <i>CYP2A6</i>	Aucune		Ariyoshi <i>et al.</i> , 2002 Ariyoshi <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP2A6*4C</i> <i>CYP2A6*4D</i>	Identique à l'allèle <i>CYP2A6*4A</i> Absence <i>CYP2A6</i>	Aucune		Oscarson <i>et al.</i> , 1999b
<i>CYP2A6*5</i>	6582G>T (G479V); Conversion génique dans la région 3' flanquante	Aucune	Aucune	Oscarson <i>et al.</i> , 1999b
<i>CYP2A6*6</i>	1703G>A (R128Q)		?	Kitagawa <i>et al.</i> , 2001
<i>CYP2A6*7</i>	6558T>C (I471T); Conversion génique dans la région 3' flanquante	?	?	Ariyoshi <i>et al.</i> , 2001 Xu <i>et al.</i> , 2002

Tableau 1: Polymorphismes du CYP 2A6. (suite).

Allèles	Modification nucléotidique et structurale	Activité enzymatique		Références
		in vivo	in vitro	
<i>CYP2A6*8</i>	6600G>T (R485L); Conversion génique dans la région flanquante 3'	↔		Ariyoshi <i>et al.</i> , 2001 Xu <i>et al.</i> , 2002 Mwenifumbo <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*9A</i>	-1013A>G; -48T>G (TATA box)	↓	↓	Pitarque <i>et al.</i> , 2001 Yoshida <i>et al.</i> , 2003 Kiyotani <i>et al.</i> , 2003 Von Richter <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP2A6*9B</i>	-1680A>G; -1301A>C; -1289G>A; -1013A>G; -48T>G (TATA box); 1620T>C; 1836G>T; 6354T>C; 6692C>G			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*10</i>	6558T>C (I471T); 6600G>T (R485L); Conversion génique dans la région flanquante 3'	↓		Yoshida <i>et al.</i> , 2002 Xu <i>et al.</i> , 2002
<i>CYP2A6*11</i>	3391T>C (S224P)	↓	↓	Daigo <i>et al.</i> , 2002
<i>CYP2A6*12A</i>	exons 1-2 de <i>CYP2A7</i> ; exons 3-9 de <i>CYP2A6</i> (substitution de 10 acides aminés)	↓	↓	Oscarson <i>et al.</i> , 2002
<i>CYP2A6*12B</i>	exons 1-2 de <i>CYP2A7</i> ; exons 3-9 de <i>CYP2A6</i> ; 1620T>C; 3396G>A; 4489C>T; 5163G>A; 5545G>C; 5717C>G; 6692C>G			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*12C</i>	exons 1-2 de <i>CYP2A7</i> ; exons 3-9 de <i>CYP2A6</i> ; 1620T>C; 1630G>C; 3396G>A; 4489C>T; 5163G>A; 5545G>C; 5717C>G; 6692C>G			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*13</i>	-48T>G; 13G>A (G5R)			Kiyotani <i>et al.</i> , 2002
<i>CYP2A6*14</i>	51G>A; 86G>A (S29N)			Kiyotani <i>et al.</i> , 2002
<i>CYP2A6*15</i>	-48T>G; 2134A>G (K194E)			Kiyotani <i>et al.</i> , 2002
<i>CYP2A6*16</i>	2161C>A (R203S)			Kiyotani <i>et al.</i> , 2002
<i>CYP2A6*17</i>	A>G51; 209C>T; 1779G>A; 4489C>T; 5065G>A (V365M); 5163G>A; 5717C>T; 5825A>G	↓	↓	Fukami <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP2A6*18A</i>	5668A>T (Y393F)		↓	Fukami <i>et al.</i> , 2005a
<i>CYP2A6*18B</i>	51G>A; 5668A>T (Y393F); 5684T>C; 5702T>C		↓	Fukami <i>et al.</i> , 2005a
<i>CYP2A6*18C</i>	-1680A>G; -1579T>C; -1464A>T; -1301A>C; -1289G>A; -1013A>G; 1620T>C; 5668A>T (Y393F); 6692C>G			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*19</i>	5668A>T (Y393F); 6354T>C: 6558T>C (I471T); Conversion génique dans la région flanquante 3'		↓	Fukami <i>et al.</i> , 2005a
<i>CYP2A6*20</i>	51G>A; 2141-2142delAA; 2296C>T; 5684T>C; 6692C>G		Aucune	Fukami <i>et al.</i> , 2005b
<i>CYP2A6*21</i>	51G>A; 6573A>G (K476R)			Haberl <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP2A6*22</i>	51G>A; 1794C>G (D158E); 1798C>A (L160I)			Haberl <i>et al.</i> , 2005

Etant donné le nombre important d'allèles différents existant pour le polymorphisme du gène CYP2A6, nous avons choisi de présenter les allèles les plus importants dans le cadre de notre travail.

2.3.1. Allèle référent dit « sauvage » CYP2A6*1A

Découvert par Yamano *et al.*, en 1990, CYP2A6*1A (Figure 6), également dénommé CYP2A6wt et CYP2A6*1A-*1B, est l'allèle de la souche sauvage du CYP2A6. L'activité enzymatique de la protéine CYP2A6*1A constitue la référence, *in vivo* comme *in vitro*, des polymorphismes CYP2A6 et est dite « normale ». Situés à proximité l'un de l'autre, les gènes CYP2A7 et CYP2A6 présentent une grande homologie nucléotidique (environ 90%) (Ariyoshi *et al.*, 2000).

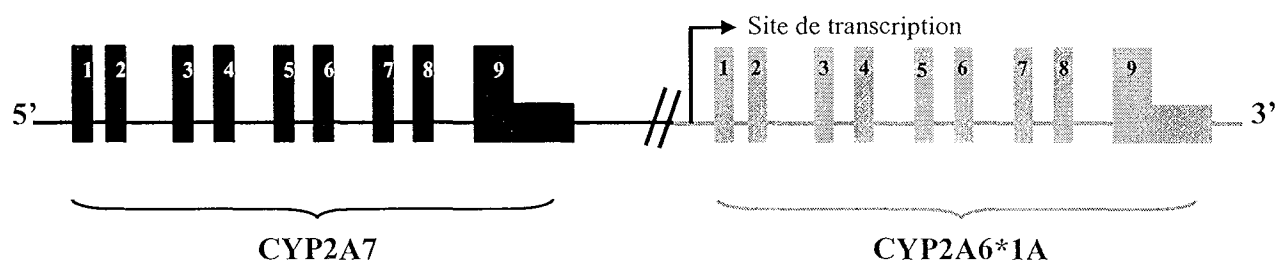


Figure 6. Représentation schématique du gène *CYP2A6*1A* et *CYP2A7*. Chaque rectangle noir ou grisé correspond à un exon.

2.3.2. Polymorphismes localisés dans la région promotrice du gène.

Les polymorphismes localisés dans la région promotrice du gène *CYP2A6* semblent affecter l'expression de ce gène. Les trois principales mutations concernées sont les substitutions -1013A>G, -745A>G et dans la région TATA box à -48T>G.

2.3.2.1. Substitution nucléotidique -1013A>G

La substitution nucléotidique A>G localisée dans la région promotrice du gène à -1013 paires de bases (-1013A>G) concerne des polymorphismes avec une seule mutation comme l'allèle *CYP2A6*1D* (Pitarque *et al.*, 2004) ou plusieurs mutations comme les allèles *CYP2A6*1J*, *CYP2A6*1J*, *CYP2A6*9* (Von Richter *et al.*, 2004) et *CYP2A6*18C* (Haberl *et al.*, 2005). Cette mutation localisée sur un site de fixation d'un facteur transcriptionnel inducteur non identifié, diminuerait l'expression du gène *CYP2A6* (Pitarque *et al.*, 2004). Néanmoins, aucun effet significatif sur la quantité d'ARNm exprimée et le taux de protéine n'est observé chez l'Homme.

2.3.2.2. Substitution nucléotidique -745A>G

Localisée au niveau de la région 5' flanquée (-745A>G) du gène, cette substitution se situe au niveau de la séquence d'ADN de la « CCAAT box », site de fixation du facteur transcriptionnel NF-Y. Sous sa forme hétérotrimérique (NF-YA, B, C), le facteur de transcription NF-Y ne peut se fixer sur son élément de réponse, provoquant alors une répression de la transcription du gène *CYP2A6*. Cette mutation concerne les polymorphismes *CYP2A6*1H* (une seule mutation) et *CYP2A6*1J* (deux substitutions) (Von Richter *et al.*, 2004 ; Rao *et al.*, 2000).

2.3.2.3. Substitution nucléotidique -48T>G site de la TATA box

Cette mutation localisée au niveau de la région « TATA box » (-48T>G) affecte l'expression du gène *CYP2A6* avec une diminution à la fois de la transcription et de l'activité enzymatique *CYP2A6* (Kiyotani *et al.*, 2003 ; Yoshida *et al.*, 2003). Elle concerne les polymorphismes *CYP2A6*9* (Von Richter *et al.*, 2004), *CYP2A6*13* et *CYP2A6*15* (Kiyotani *et al.*, 2002)

2.3.3. Polymorphismes localisés dans la région codante du gène.

2.3.3.1. Impliqués dans une diminution de l'activité enzymatique

Les principaux allèles responsables d'une diminution, voire une absence totale d'activité enzymatique du *CYP2A6*, sont nombreux. Parmi ces allèles, *CYP2A6*4* est retrouvé dans la population asiatique avec une fréquence relativement importante mais faible chez les Caucasiens (Nakajima *et al.*, 2002). Avec trois variants, *CYP2A6*4* correspond à une délétion du gène *CYP2A6* avec absence de synthèse de la protéine *CYP2A6* (Kitagawa *et al.*, 2001). Il est probable que ces trois allèles délétés, connus comme étant des entités distinctes, soient en fait les mêmes allèles (Rautio *et al.*, 2001). C'est l'exemple de l'allèle *CYP2A6*4C* également nommé *CYP2A6*4A*. Les différences interethniques dans la distribution de l'allèle *CYP2A6*4* semble indiquer que cette délétion du gène *CYP2A6* soit un événement génétique relativement récent, intervenu après la séparation du Caucase de l'Asie il y a 35 000 ans. (Oscarson *et al.*, 1999a).

La diminution de l'activité enzymatique du *CYP2A6* est le plus souvent due à une ou plusieurs mutations nucléotidiques avec pour conséquence la substitution d'un acide aminé par un autre. Des régions vitales de la protéine comme celle permettant l'incorporation de l'hème peuvent être affectées. C'est par exemple le cas de l'allèle *CYP2A6*2* (1799T>A) (Oscarson, 2001 ; Zabetian *et al.*, 2000) et de l'allèle *CYP2A6*6* (1703 G>A) (Kitagawa *et al.*, 2001). Une autre région de la protéine sensiblement perturbée est le site catalytique de l'enzyme. Ainsi, l'exemple de l'allèle *CYP2A6*7* (6558T>C) montre que les petits substrats comme la coumarine, sont peu affectés alors que les substrats volumineux, comme la nicotine, sont moins bien ou non métabolisés par le *CYP2A6*. D'autres polymorphismes avec modification du site catalytique ont été décrits pour les allèles *CYP2A6*10* (Yoshida *et al.*, 2002 ; Xu *et al.*, 2002 ; Kitagawa *et al.*, 2001), *CYP2A6*11* (Daigo *et al.*, 2002), *CYP2A6*17* (Fukami *et al.*, 2004), *CYP2A6*18* et *CYP2A6*19* (Fukami *et al.*, 2005a) et *CYP2A6*20* pour

lesquels la perte de deux nucléotides a provoqué une « frame-shift » avec formation d'un précurseur codon stop sur l'exon cinq et naissance d'une protéine tronquée et inactive (Fukami *et al.*, 2005b).

La diminution de l'activité enzymatique du CYP2A6 peut aussi être due à une instabilité de la protéine. C'est le cas de l'allèle *CYP2A6*12A* qui résulte d'un crossing-over inégal entre les gènes *CYP2A6* et *CYP2A7* et qui a pour effet d'engendrer une substitution de dix acides aminés, aboutissant à une protéine moins stable et plus rapidement dégradée (Oscarson *et al.*, 2002). Est concerné aussi l'allèle *CYP2A6*5* qui à partir d'une simple mutation nucléotidique G>T sur l'exon 9 (6582G>T) a amené une substitution en position 479 de la glycine par la valine (Oscarson *et al.*, 1999b) avec inactivation et dégradation plus rapide de la protéine (Oscarson, 2001).

En résumé, les allèles *CYP2A6*5*, *CYP2A6*7*, *CYP2A6*10* et *CYP2A6*11* sont spécifiques de la population asiatique alors que *CYP2A6*2* et *CYP2A6*12* le sont chez les caucasiens (Nakajima *et al.*, 2002 ; Oscarson *et al.*, 2002) et *CYP2A6*17*, *CYP2A6*20* chez les afro-américains (Fukami *et al.*, 2005b ; Fukami *et al.*, 2004).

2.3.3.2. Polymorphismes avec augmentation de l'activité enzymatique

A ce jour, deux polymorphismes sont associés à une activité enzymatique augmentée. Ce sont les allèles *CYP2A6*1X2* et *CYP2A6*1B* (Pitarque *et al.*, 2004).

2.3.3.2.1. Allèle *CYP2A6*1X2*

L'allèle *CYP2A6*1X2* correspond à une duplication du gène *CYP2A6* (Rao *et al.*, 2000). Cet allèle est l'opposé de l'allèle *CYP2A6*4*, résultat du crossing over inégal entre la région 3' flanquée du *CYP2A6* et celui du gène *CYP2A7*. Il semblerait que les fumeurs homozygotes *CYP2A6*1X2* aient des taux de cotinine plasmatique plus élevés que les homozygotes *CYP2A6*1A*. Chez les Japonais, la fréquence du *CYP2A6*1X2* est de 0% (Yoshida *et al.*, 2002) et de 1,7% chez les Caucasiens (Rao *et al.*, 2000).

2.3.3.2.2. Allèle *CYP2A6*1B*

Depuis peu, la sous famille *CYP2A6*1B* a été scindée en 12 variants dénommés *CYP2A6*1B1* à *CYP2A6*1B12* (Haberl *et al.*, 2005). Ces 12 polymorphismes *CYP2A6*1B* ont tous en commun une conversion génique d'environ 72 paires de bases du *CYP2A7* dans la région non traduite 3'-flanquée (21 nucléotides différents) (Haberl *et al.*, 2005 ; Nakajima *et al.*, 2001). A ce jour et à notre connaissance, aucune étude sur les conséquences en terme d'activité et les fréquences des différents polymorphismes *CYP2A6*1B* n'a été publiée.

Les polymorphismes *CYP2A6*1B1* et *CYP2A6*1B2* correspondent à l'ancienne dénomination *CYP2A6*1B*. Le polymorphisme *CYP2A6*1B1* présente uniquement la conversion génique dans la région 3' non traduite et le polymorphisme *CYP2A6*1B2* possède en plus une substitution A>G dans la région promotrice en position -1013. Néanmoins, aucun effet significatif sur la quantité d'ARNm exprimé ou sur le taux de protéine n'a été observé chez l'Homme pour le polymorphisme *CYP2A6*1D*, allèle possédant la même et unique substitution que l'allèle *CYP2A6*1B2* (Haberl *et al.*, 2005). Il est plus que probable que les conséquences des polymorphismes *CYP2A6*1B2* et *CYP2A6*1B1* soient identiques. Par conséquent, la suite de notre travail portera uniquement sur l'allèle *CYP2A6*1B* (**Figure 7**).

La grande homologie entre le gène *CYP2A6* et le gène *CYP2A7* rend très difficile le génotypage du polymorphisme *CYP2A6*1B* (Ariyoshi *et al.*, 2000 ; Oscarson *et al.*, 1999a). Fernandez-Salguero *et al.*, 1995, ont fait les frais de cette difficulté en publiant des résultats erronés sur la fréquence du polymorphisme *CYP2A6*3* dans la population Caucasienne.

Les sujets porteurs de l'allèle *CYP2A6*1B* ont une activité enzymatique augmentée avec une plus grande capacité à métaboliser la nicotine en cotinine d'où de nombreuses implications dans l'attitude des fumeurs. Ces individus homozygotes *CYP2A6*1B* ont à la fois des taux d'ARNm et de protéines *CYP2A6* plus élevés. La mutation qui est localisée dans la région 3' non transcrite du gène *CYP2A6* modifie la stabilité de l'ARNm en augmentant le temps de demi-vie de celle-ci (Wang *et al.*, 2006 ; Heidbreder *et al.*, 2004 ; Rautio *et al.*, 2001).

La fréquence allélique du polymorphisme *CYP2A6*1B* dans la population caucasienne est d'environ 30% (Oscarson, 2001) et 40% dans la population asiatique (Ujijin *et al.*, 2002 ; Yoshida *et al.*, 2002).

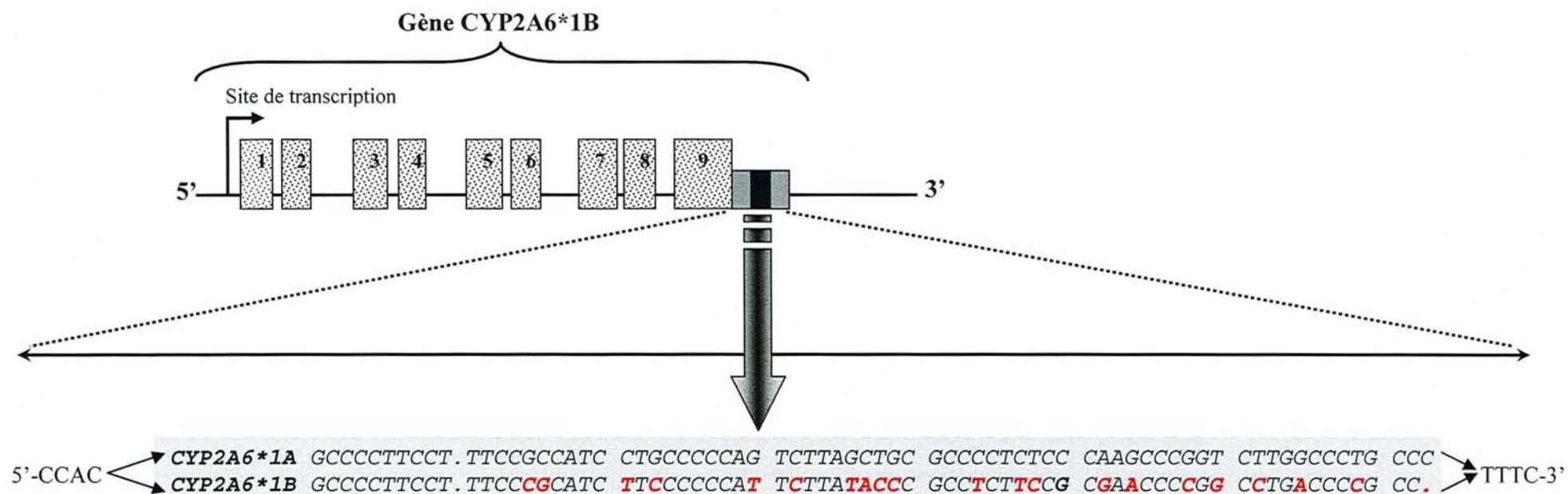


Figure 7. Représentation schématique du gène *CYP2A6*1B*. Région traduite; Séquence nucléotidique au niveau de l'exon 9 et région 3' transloquée avec le *CYP2A7*. Les nucléotides rouges représentent les uniques mutations nucléotidiques par rapport au *CYP2A6*1A*.

2.4. Conséquence des polymorphismes de CYP2A6

2.4.1. Polymorphismes de CYP2A6 et cancer

Plusieurs procarcinogènes environnementaux contenus dans la nourriture ou la fumée de tabac, notamment les nitrosamines et les hydrocarbures aromatiques polycycliques, sont impliqués dans les processus de cancérisation chez l'homme (Ariyoshi *et al.*, 2002). Le CYP2A6 apparaît comme l'un des principaux déterminants génétiques dans le comportement tabagique mais aussi dans la probabilité de développer un cancer pulmonaire, colique, ORL, pancréatique, ou hépatique lié au tabac (Malaiyandi *et al.*, 2005 ; Fujieda *et al.*, 2004 ; Nishikawa *et al.*, 2004). En métabolisant les N-nitrosamines contenues dans la fumée de cigarette, notamment celles qui sont riches en groupement alkylés, le CYP2A6 génère des espèces réactives qui vont se lier par liaison covalente à l'ADN. Une fois endommagé, l'ADN peut être réparé mais dans le cas contraire, l'initiation du processus cancéreux sera lancée (Kamataki *et al.*, 2005).

Le méthoxsalène est un inhibiteur du CYP2A6 utilisé dans le traitement du psoriasis (Kharasch *et al.*, 2000 ; Koenigs *et al.*, 1997). L'utilisation de cet inhibiteur chez le fumeur, perturbe la façon de fumer de celui-ci, notamment en espaçant les prises et en diminuant le nombre de cigarettes fumées. Le méthoxsalène diminue aussi l'activation de substrats procarcinogènes par le CYP2A6. Les études génétiques et biomédicales montrent bien qu'une diminution d'activité du CYP2A6 réduit la quantité de procarcinogènes actifs provenant du tabac (Sellers *et al.*, 2003 ; Takeuchi *et al.*, 2003 ; Sellers *et al.*, 2000).

Les sujets CYP2A6 dits « métaboliseurs lents » synthétisent moins de dérivés N-nitrosamines cancérogènes par absence du gène *CYP2A6* ou par défaut d'activité de la protéine CYP2A6 et présenteraient un risque plus faible de développer un cancer des poumons et plus particulièrement ceux à petites cellules. Ces individus dits « métaboliseurs lents » sont porteurs des polymorphismes CYP2A6*4, CYP2A6*7, CYP2A6*9 et CYP2A6*10 (Kamataki *et al.*, 2005 ; Miyamoto *et al.*, 1999 ; Kamataki *et al.*, 1999) (**Figure 8**).

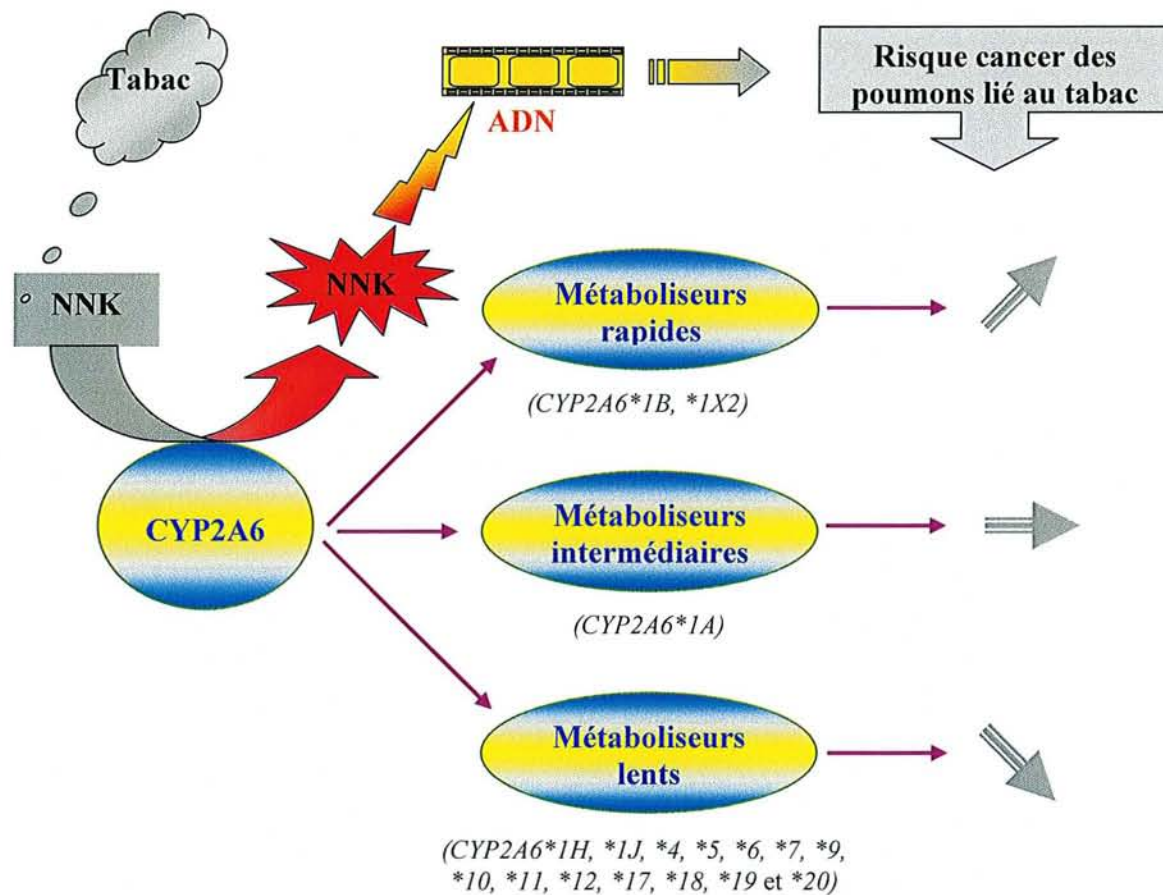


Figure 8. Polymorphismes génétiques du CYP2A6 et risque de cancer des poumons lié au tabac d'après Kamataki *et al.*, (2005). NNK, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone ; ADN, Acide désoxyribonucléique. Le sens de la flèche indique l'augmentation ou la diminution de l'activité.

Certaines études n'ont pas mis en évidence de relation entre génotype *CYP2A6* et cancer pulmonaire (Lorriot *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 1999). Néanmoins, la probabilité de développer un cancer pulmonaire est beaucoup plus faible chez les sujets dits « métaboliseurs lents » et consommant un grand nombre de cigarettes par jour que chez les « métaboliseurs rapides » et fumant peu de cigarettes par jour. Cela confirme bien la relation génotype *CYP2A6* et cancer pulmonaire chez le fumeur (Kamataki *et al.*, 2005).

2.4.2. Polymorphismes CYP2A6, nicotine et tabagisme

2.4.2.1. Variations interindividuelles et interethniques du métabolisme de la nicotine

Chez l'Homme, environ 80% de la nicotine sont métabolisés en cotinine et approximativement 90% de ce métabolisme est réalisé par le CYP2A6 (Messina *et al.*, 1997 ; Benowitz *et al.*, 1994). Il existe de nombreuses variations interindividuelles dans l'activité du CYP2A6 (Rautio, 2003). Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs polymorphismes du *CYP2A6* ont été décrits. Que ce soit des mutations au niveau des régions régulatrices (*CYP2A6*1B*, *CYP2A6*1C*, *CYP2A6*1D*, *CYP2A6*1H*, *CYP2A6*1J* ou *CYP2A6*9*) ou au niveau des régions codantes (*CYP2A6*2*, *CYP2A6*4*, *CYP2A6*5*, *CYP2A6*6*, *CYP2A6*7*, , *CYP2A6*10*, *CYP2A6*11*, *CYP2A6*12*, *CYP2A6*17*, *CYP2A6*18*, *CYP2A6*19* et *CYP2A6*20*), l'activité enzymatique s'en trouve, le plus souvent, partiellement ou totalement affectée (**Tableau 1**).

Les fréquences alléliques *CYP2A6* varient en fonction des populations (**Tableau 2**). Les sujets porteurs d'allèles associés à une diminution de l'activité du CYP2A6 sont plus fréquent dans la population asiatique (Chinois, Coréens et Japonais) que caucasienne ou afro-américaine (**Figure 9**). Mais au sein même de cette population asiatique, la fréquence allélique, notamment pour l'allèle *CYP2A6*4* qui est dépourvu d'activité enzymatique, fluctue du simple au double entre la population japonaise et chinoise (Schoedel *et al.*, 2004 ; Kwon *et al.*, 2001).

Tableau 2. Variations interethniques et fréquences alléliques des polymorphismes CYP2A6

(D'après Malaiyandi *et al.*, 2005 ; Fukami *et al.*, 2005a ; Fukami *et al.*, 2005 ; Pitarque *et al.*, 2004 ; Fukami *et al.*, 2004 ; Yoshida *et al.*, 2002 ; Ujjin *et al.*, 2002 ; Oscarson, 2001 ; Pitarque *et al.*, 2001 ; Miyamoto *et al.*, 1999 ; Nunoya *et al.*, 1999a ; Nunoya *et al.*, 1999b ; Oscarson *et al.*, 2002)

Allèle CYP2A6	Afro Américains	Caucasiens	Turcs	Chinois	Japonais	Coréens
Activité Diminuée						
1. Région promotrice						
<i>CYP2A6*1H</i>		3,1%	5,2%			
<i>CYP2A6*1J</i>		0%	1,8%			
<i>CYP2A6*9 (A et B)</i>	7,1%	5,2-7,2%		15,6-15,7%	20,3-21,3%	22,3%
<i>CYP2A6*13,</i> <i>CYP2A6*15</i>		0%			1,5%	
2. Région codante						
<i>CYP2A6*2</i>	0,3-1,1%	1,1-3,0%		0-0,7%	0%	0%
<i>CYP2A6*4</i>	1,9%	0,5-1,4%		3,2-15,1%	20,1-24,2%	11,0%
<i>CYP2A6*5</i>	0%	0-0,1%		0-0,5%	0%	0-0,5%
<i>CYP2A6*6</i>					0-0,4%	0%
<i>CYP2A6*7</i>	0%	0-0,3%		2,2-9,8%	6,3-12,5%	3,6%
<i>CYP2A6*10</i>	0%	0%		0,4-4,0%	1,1-3,2%	0,5%
<i>CYP2A6*11</i>					5 patients	
<i>CYP2A6*12</i>	0,4%	2,0-2,2%		0%	0,8%	
<i>CYP2A6*17</i>	9,4%	0%			0%	0%
<i>CYP2A6*18</i>	0%	1,1%			0%	0,5%
<i>CYP2A6*19</i>	0%	0%			0,5%	1,0%
<i>CYP2A6*20</i>	1,6%	0%			0%	0%
Activité Augmentée						
<i>CYP2A6*1x2</i>		1,7%			0%	0,5%
<i>CYP2A6*1B</i>		30,0-32,8%	28,0%	40,6%	41,3%	37,1-42,8%

2.4.2.2. Polymorphisme CYP2A6 et dépendance nicotinique

Les génotypes *CYP2A6* semblent affecter les habitudes tabagiques, la dépendance nicotinique et le syndrome de sevrage. Les fumeurs porteurs d'un ou deux allèles inactifs (*CYP2A6*2*, *CYP2A6*3* ou *CYP2A6*4*) sont décrits comme des sujets commençant à fumer à un âge plus avancé, pendant une période plus courte et s'abstenant plus facilement que les sujets porteurs de « l'allèle sauvage » (*CYP2A6*1*) (Kubota *et al.*, 2006 ; Rao *et al.*, 2000 ; Gu *et al.*, 2000).

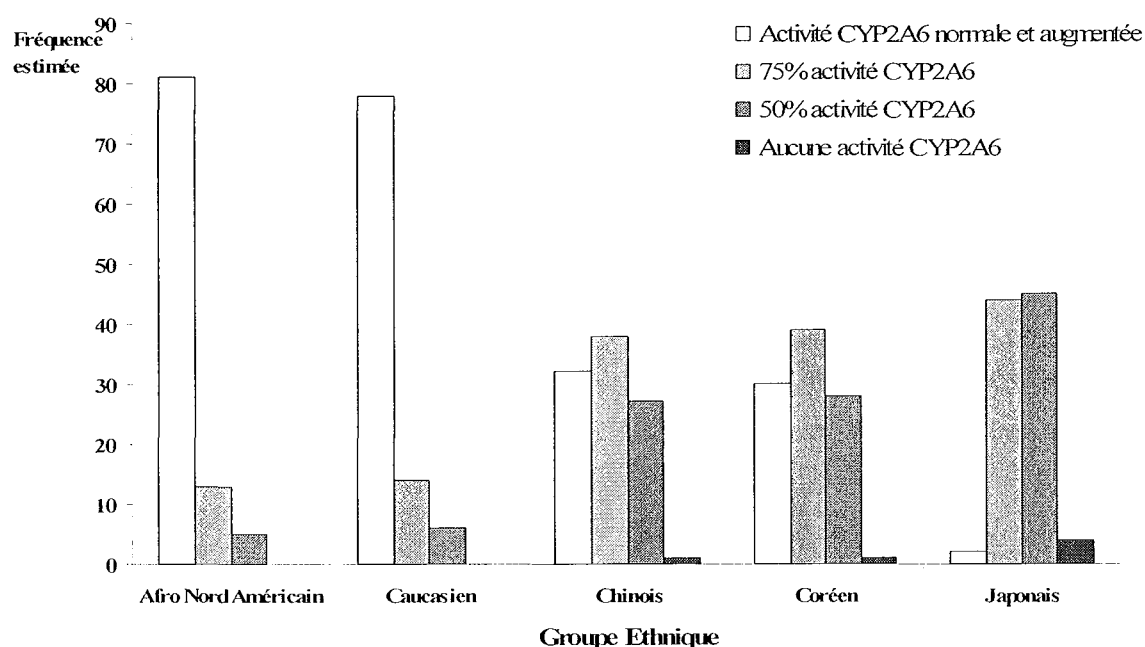


Figure 9 : Activité enzymatique CYP2A6 en fonction des groupes ethniques d'après Malaiyandi *et al.*, (2005).

A l'évidence, les fumeurs ajustent leur consommation journalière de cigarettes afin de maintenir une concentration cérébrale suffisante de nicotine. Au vu des nombreux polymorphismes *CYP2A6*, il existe une grande variabilité interindividuelle dans le métabolisme de la nicotine et les concentrations plasmatiques de nicotine (Malaiyandi *et al.*, 2005 ; Nakajima *et al.*, 2001 ; Wood et Conney, 1974). Aux premières cigarettes fumées, les sujets porteurs d'un allèle *CYP2A6* inactif (*CYP2A6**2, *CYP2A6**3 ou *CYP2A6**4) auraient des concentrations plasmatiques de nicotine plus élevées ou prolongées avec pour conséquence une accentuation des effets néfastes de la nicotine. Ainsi, les métaboliseurs lents de la nicotine auraient un risque plus faible de devenir dépendant au tabac (Malaiyandi *et al.*, 2005 ; Tyndale *et al.*, 2001).

Néanmoins, il est tout à fait possible que des taux de nicotine persistant au niveau cérébral puissent augmenter la dépendance à la nicotine. Une sensibilité accrue à la nicotine lors d'une première expérience tabagique se traduirait chez ces nouveaux fumeurs par un risque plus important de devenir dépendant à la nicotine (Pomerleau, 1995 ; Pomerleau *et al.*, 1993). Dans une étude rétrospective, les femmes fumeuses très dépendantes à la nicotine, décrivent un certain bien être lors de leurs premières cigarettes (Pomerleau *et al.*, 1998), alors que pour d'autres également dépendant au tabac, des effets indésirables tels que vertiges et nausées (DiFranza *et al.*, 2004).

Plusieurs études ont comparé les fumeurs porteurs de l'allèle *CYP2A6*1A* versus l'allèle *CYP2A6*1B*. Récemment, il a été mis en évidence que les sujets possédant une seule copie de l'allèle *CYP2A6*1B* étaient, d'une part, sur-représentés chez les non fumeurs comparés aux fumeurs et d'autre part, la probabilité pour qu'ils deviennent dépendants à la nicotine étaient plus faible (Vasconcelos *et al.*, 2005).

2.4.2.3. Polymorphisme CYP2A6 et quantité de cigarettes fumées par jour

Deux méta-analyses ont vérifié l'hypothèse selon laquelle les sujets porteurs d'allèles *CYP2A6* défectueux fumeraient moins de cigarettes (Munafo *et al.*, 2004 ; Carter *et al.*, 2004). Leurs conclusions n'ont montré aucune association entre le génotype *CYP2A6* et la quantité de cigarettes fumées. Néanmoins, une étude cinétique chez des adultes fumeurs a démontré en calculant le ratio de la 3-hydroxycotinine sur la cotinine, reflet de l'activité *CYP2A6*, que la quantité de cigarettes fumées par jour était liée à l'activité du *CYP2A6* (Benowitz *et al.*, 2003).

De plus, certaines études ont confirmé que le nombre de cigarettes fumées chez les sujets porteurs d'un ou plusieurs allèles *CYP2A6* défectueux était plus faible comparé aux autres groupes (Schoedel *et al.*, 2004 ; Fujieda *et al.*, 2004 ; Ariyoshi *et al.*, 2002). Dans ces études, les sujets porteurs de l'allèle défectueux *CYP2A6* sont comparés aux sujets dits « sauvages » génotypés *CYP2A6*1/*1* (regroupant à la fois *CYP2A6*1A* et *CYP2A6*1B*). L'étude d'Ariyoshi *et al.*, 2002, a montré que les sujets homozygotes *CYP2A6*1B* avaient tendance à fumer un plus grand nombre de cigarettes que les sujets homozygotes *CYP2A6*1A*, mais aucune étude statistique n'a été réalisée.

Néanmoins, cette étude a démenti que les sujets dits « sauvages » homozygotes *CYP2A6*1A* n'étaient pas ceux qui fument le plus de cigarettes par jour. *CYP2A6* est la principale enzyme responsable du métabolisme hépatique de la nicotine (Messina *et al.*, 1997 ; Nakajima *et al.*, 1996). Les sujets porteurs des deux allèles *CYP2A6*1B* sont considérés comme des métaboliseurs rapides (MR) de la nicotine comparés aux métaboliseurs normaux que sont les sujets homozygotes *CYP2A6*1A* (Schoedel *et al.*, 2004). En comparant les sujets porteurs de l'allèle *CYP2A6*1X2*, considérés comme métaboliseurs rapides de la nicotine, aux sujets homozygotes *CYP2A6*1* qui regroupent les génotypes *CYP2A6*1A* et *CYP2A6*1B*, l'étude n'a pas mis en évidence de différence significative du nombre de cigarettes fumées (Tyndale et Sellers, 2002).

L'étude du gène *CYP2A6* explique la variabilité interindividuelle et interethnique de la rapidité à métaboliser la nicotine en cotinine. Les études conduites suggèrent que les individus présentant le génotype métaboliseur lent *CYP2A6* ont une cinétique du métabolisme de la nicotine altérée, ce qui conduirait à une diminution des quantités de cigarettes fumées.

2.4.3. Polymorphisme CYP2A6, tabac et maladies cardiovasculaires

Le tabac est considéré comme l'un des principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Les données épidémiologiques montrent qu'il existe un bénéfice à arrêter de fumer. Selon les études, le délai au terme duquel les ex-fumeurs ont un risque cardiovasculaire équivalent à celui de sujets n'ayant jamais fumé est variable allant de quelques années à plus de vingt ans. Les mécanismes des complications cardiovasculaires liées au tabagisme expliquent que ce bénéfice peut être rapidement obtenu contrairement aux complications respiratoires ou aux cancers bronchiques. Dans tous les cas, c'est l'arrêt le plus précoce possible qui doit être recherché (Ben Shlomo *et al.*, 1994 ; Dobson *et al.*, 1991).

D'une part, étant donné que *CYP2A6* métabolise l'acide arachidonique en un métabolite vasoconstricteur, il pourrait jouer un rôle dans la régulation de la tension artérielle (Rifkind *et al.*, 1995). D'autre part, le nombre de cigarettes fumées par jour est corrélé à certains polymorphismes du gène *CYP2A6* (Schoedel *et al.*, 2004) et à l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaires (Burns, 2003). Cependant, aucune étude à ce jour, à notre connaissance, n'a été publiée concernant une éventuelle relation entre *CYP2A6* et les maladies cardiovasculaires. Le risque de survenue de pathologies cardiovasculaires est corrélé au nombre de cigarettes fumées par jour et à la durée du tabagisme (Burns, 2003). En effet, le risque d'hémorragie cérébrale chez les fumeurs augmente avec le nombre de cigarettes fumées par jour (Kurth *et al.*, 2003a ; Kurth *et al.*, 2003b), le risque relatif de maladie coronaire des grands fumeurs (plus de 20 cigarettes par jour) est multiplié par plus de 3 par rapport aux non-fumeurs (Ducimetière *et al.*, 1982), par 2 pour les claudications intermittentes (Burns, 2003) et par 5,5 pour l'infarctus du myocarde chez les femmes âgées de 30 à 55 ans fumant plus de 25 cigarettes par jour (Willett *et al.*, 1987). Ici certaines données tendent à suggérer un rôle potentiel du *CYP2A6* dans la physiopathologie cardiovasculaire.

Les données associant le tabagisme et d'autres enzymes à cytochromes P450 sont très limitées. Cependant, des études associent le polymorphisme *CYP1A1* avec le risque de cancer chez le fumeur (Garcia-Closas *et al.*, 1997) mais également aux maladies cardiovasculaires (Wang *et al.*, 2003a).

3. CYP1A1, récepteur AhR et tabac

Les cytochromes P450 sont depuis de nombreuses années impliqués dans la production endogène de métabolites de l'acide arachidonique. Ce métabolisme, soit par la production d'acides époxyeicosatriénoïques (EETs), soit par la production d'acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs), joue un rôle dans la vasomotricité et le tonus vasculaire. Toute interaction avec les cytochromes P450 est susceptible de modifier le potentiel vasomoteur des parois vasculaires (Fisslthaler *et al.*, 2000, Lasker *et al.*, 2000 ; Bolz *et al.*, 2000 ; Rahman *et al.*, 1997) (**Figure 10**). Le cytochrome P4501A1 est essentiellement impliqué dans la détoxification de molécules exogènes, comme les produits de combustion du tabac (Guengerich, 1988). Il intervient également dans le catabolisme de composés endogènes comme l'acide arachidonique (Falck *et al.*, 1990).

3.1. CYP1A1 et métabolisme de l'acide arachidonique

L'implication du CYP1A1 dans le métabolisme de l'acide arachidonique (AA) a été très controversée. Le CYP1A1 est une ω , ω -1 hydroxylase de l'acide arachidonique, active en C19 et C16 respectivement (Falck *et al.*, 1990), cependant il semble ne produire qu'une quantité faible et variable d'EETs (Hasler, 1999). Toutefois, Gannon *et al.*, (2000) affirment que le CYP1A1 des cellules endothéliales n'est pas une époxygénase de l'acide arachidonique et par conséquent un facteur hyperpolarisant de l'endothélium ou *Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF). Cela ne signifie pas que le CYP1A1 n'oxyde pas l'acide arachidonique pour produire des substances vasodilatrices puisque l'induction de CYP1A1 provoque une augmentation de l'hyperpolarisation (Adeagbo, 1997).

Les travaux récents de Schwarz *et al* (2004) ont montré que le CYP1A1 humain métabolisait principalement l'acide arachidonique en C19 par la voie ω -1 hydroxylase et peu de dérivés EETs. Par contre, avec pour substrat l'acide eicosapentaénoïque (EPA), le CYP1A1 présente majoritairement une activité époxygénase pour synthétiser un dérivé EET, l'acide 17(R), 18(S)-époxyeicosatétraénoïque (17(R),18(S)-EETeTr). Ces principaux métabolites synthétisés par le CYP1A1 semblent affecter la régulation du tonus vasculaire. Les études chez l'animal ont montré que le 19OH-AA était un vasodilatateur rénal chez le rat (Carroll *et al.*, 1996) et les époxydes de l'EPA, dont le 17(R), 18(S)-EETeTr, étaient des vasodilatateurs des vaisseaux coronariens chez le chien et le porc (Zhang *et al.*, 2001). Les époxydes EPA ont des effets vasodilatateurs plus importants que les métabolites EETs de l'acide arachidonique

(Schwarz *et al.*, 2005). Leur action vasodilatatrice se fait via les canaux potassiques calcium dépendants des cellules musculaires lisses des vaisseaux (Lauterbach *et al.*, 2002) et des canaux potassiques cardiaques ATP dépendants (Lu *et al.*, 2002). En conclusion, le CYP1A1 métabolise l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque en métabolites vasodilatateurs.

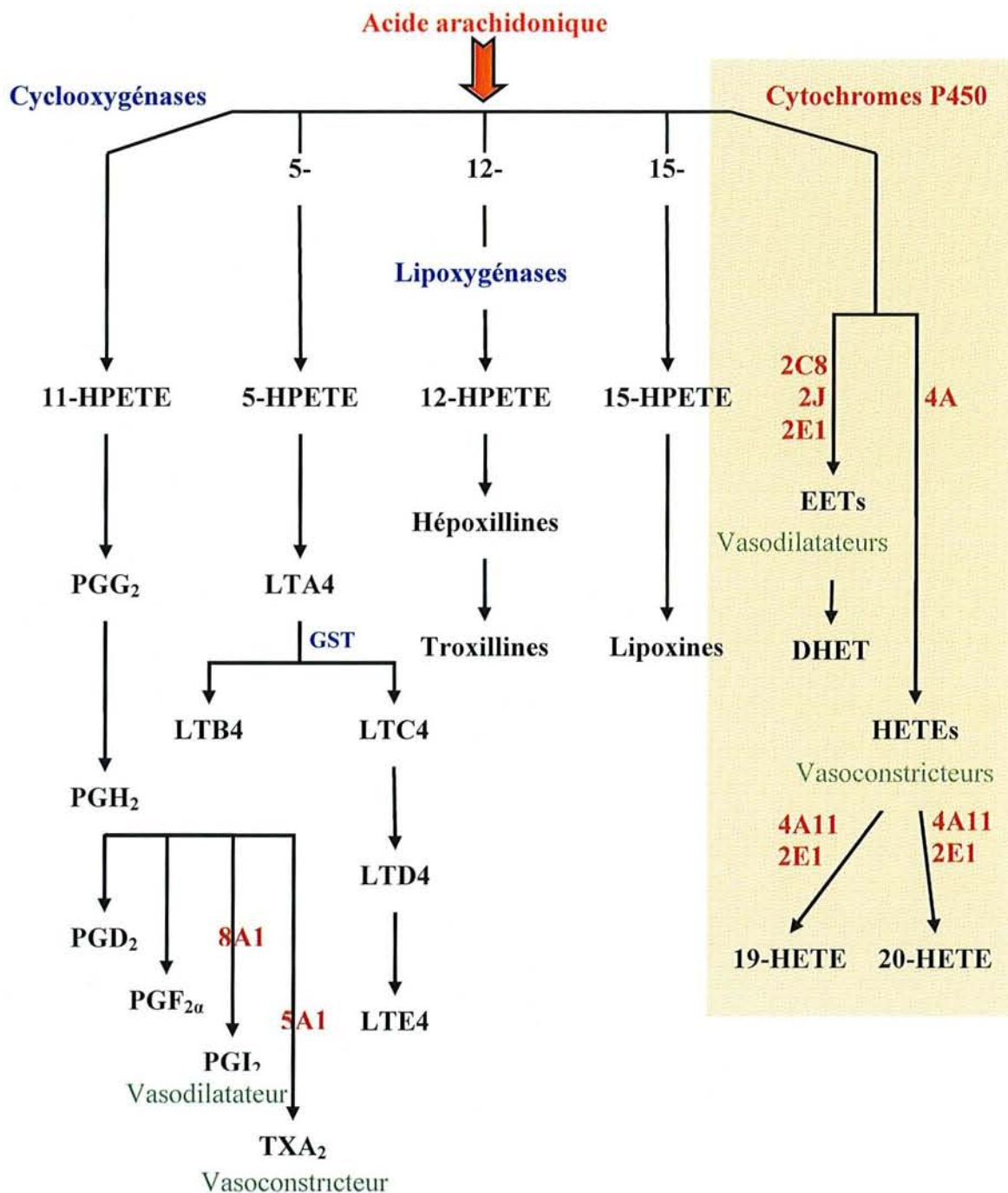


Figure 10. Métabolisme de l'acide arachidonique (AA). L'AA est métabolisé par la voie des cyclooxygénases, des lipoxygénases et des cytochromes P450. Les différentes familles de P450 impliquées sont notées en marron, GST (Glutathion S-transférase), EETs (acides époxyeicosatriénoïques), HETEs (acides hydroxyeicosatétraénoïques), DHET (acide dihydroeicosatétraénoïque), HPETE (acide hydroxypentaéicosatétraénoïque), PG (prostaglandine), TX (tromboxane), LT (leucotriène).

3.2. Polymorphismes de CYP1A1

Le gène *CYP1A1* possède sept exons pour une taille d'environ 6 Kb, il est localisé chez l'homme sur le chromosome 15 (15q22-q24) (Corchero *et al.*, 2001). Outre l'allèle sauvage, 14 allèles polymorphiques sont répertoriés à ce jour (<http://imm.ki.se/CYPalleles/>) (figure 11).

Le CYP1A1 contribuerait à l'incidence des cancers induits par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) dans les organes extra-hépatiques (Shimada *et al.*, 1996), comme le cancer des poumons, du sein (Okobia *et al.*, 2005), des ovaires (Aktas *et al.*, 2002), de la vésicule biliaire (Tsuchiya *et al.*, 2002) et des leucémies aiguës (Mathonnet *et al.*, 2003).

Plus de 400 publications cherchent à associer les polymorphismes de CYP1A1 avec différents cancers : poumon, colon, sein, voies aérodigestives, pancréas, leucémies... L'augmentation du risque de cancer du poumon (Le Marchand *et al.*, 2003 ; Nakachi *et al.*, 1993), des ovaires (Aktas *et al.*, 2002) et de la vésicule biliaire (Tsuchiya *et al.*, 2002) est corrélée avec le polymorphisme (Isoleucine-Valine) de l'exon 7 (2455A>G). Il a été démontré que les adduits des hydrocarbures mesurés dans les leucocytes sont en quantité plus élevée chez les fumeurs porteurs de la mutation dans l'exon 7 que chez ceux qui ne sont pas porteurs de cette mutation (Mooney *et al.*, 1997). L'allèle *CYP1A1**2B qui correspond à la mutation *MspI* et à l'exon 7 (Hayashi *et al.*, 1991) serait aussi corrélé à une augmentation des cancers liés au tabac (Kiyohara *et al.*, 1998 ; Kiyohara *et al.*, 1996 ; Crofts *et al.*, 1994).

Le polymorphisme *CYP1A1**2A ou *MspI* présente une substitution T>C en position 3801 dans la région 3' flanquante du gène. Présent chez 10% des Caucasiens (Chevalier *et al.*, 2001 ; Garte, 1998 ; Cascorbi *et al.*, 1996), l'allèle *MspI* génère une protéine fortement inducible pour les hydrocarbures et une activité enzymatique augmentée (Garte *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2002) associée à l'augmentation du cancer du poumon chez les fumeurs (Wang *et al.*, 2003b ; Alexandrov *et al.*, 2002 ; Kawajiri *et al.*, 1993 ; Nakachi *et al.*, 1993).

Les variations génétiques de *CYP1A1* contribuent aux susceptibilités interindividuelles des cancers liés au tabac mais aussi aux maladies cardiovasculaires (Wang *et al.*, 2002).

Chromosome Humain 15 15q22-q24 6kb

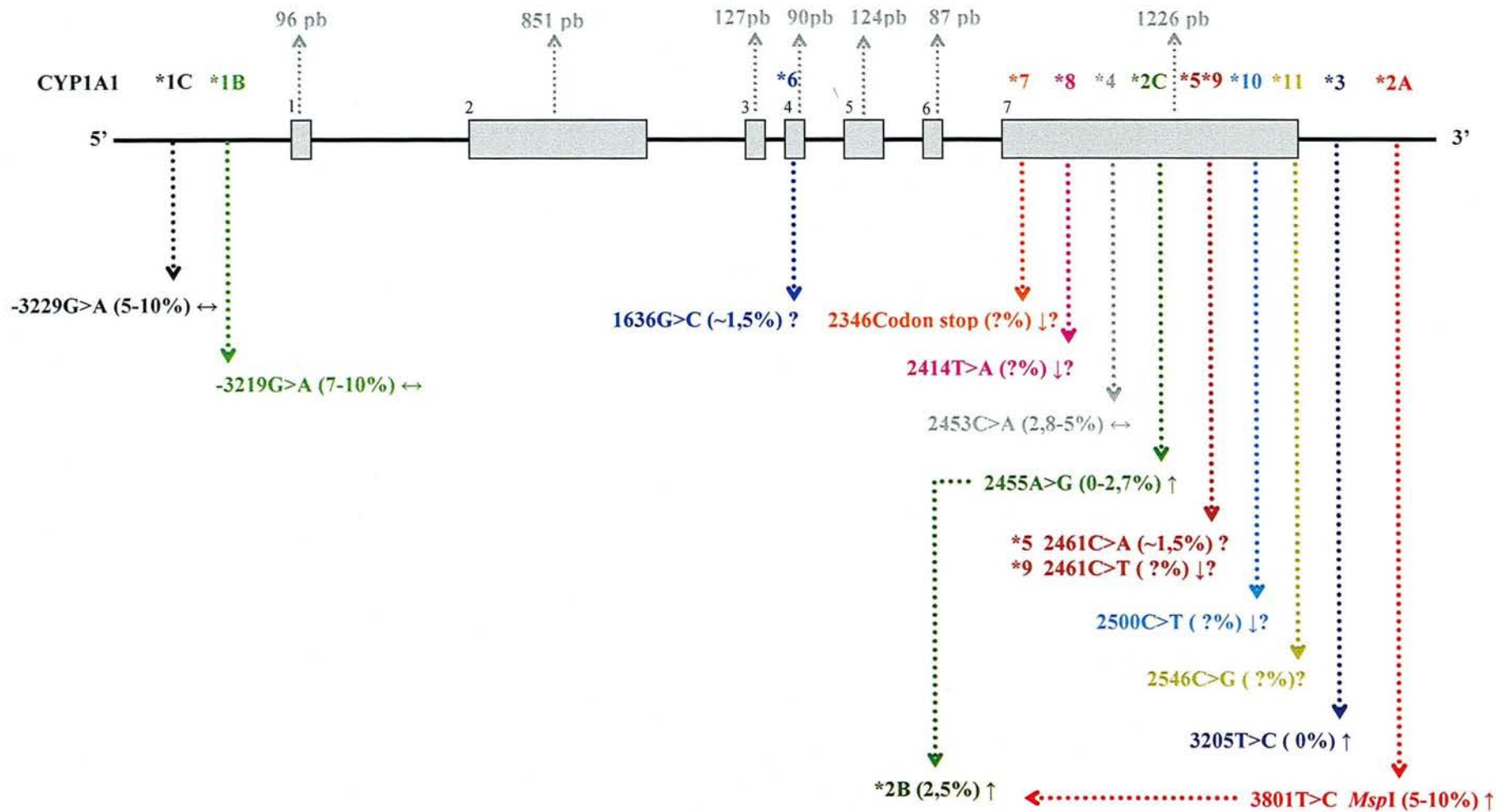


Figure 11. Principaux polymorphismes du gène *CYP1A1*. Les exons sont symbolisés par des rectangles ou carrés gris avec la taille en pb. La nature et la position des mutations connues du gène sont précisées sur la figure, la fréquence dans la population Caucasienne entre parenthèses et les conséquences sur l'activité catalytique par un sigle (↑ augmentation, ↓ diminution, ↔ aucune modification, ? incertain ou inconnu).

3.3. CYP1A1 et Régulation par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

3.3.1. CYP1A1 et métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les HAPs sont renfermés, comme des centaines d'autres substances, dans les goudrons résidus de la combustion de cigarette (Hecht, 1999). Peu exprimé dans le foie mais dans les organes extra-hépatiques (Edwards *et al.*, 1998), le CYP1A1 est présent dans les poumons (Willey *et al.*, 1997), la peau (Sadek et Hoffmann, 1994), le colon (Fontana *et al.*, 1999), les lymphocytes (Mooney *et al.*, 1997 ; Landy *et al.*, 1994), les monocytes et macrophages (Hodges *et al.*, 2000) et dans les tissus cardiovasculaires, notamment les cellules musculaires lisses des tissus cardiaques et artériels (Thum et Borlak, 2000) et les cellules endothéliales (Farin *et al.*, 1994). Le CYP1A1 est important en Toxicologie car il métabolise ces HAPs de la fumée de cigarette comme le benzo(a)pyrene en substances mutagènes et carcinogènes (Wang *et al.*, 2003b) (**Figure 12**).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques et polyhalogénés comme le TCDD (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzodioxine), les nitrosamines ou le benzo(a)pyrene induisent les CYP1A1 par l'intermédiaire du récepteur « arylhydrocarbon » (AhR) (Mimura et Fujii-Kuriyama, 2003). Cette induction associée aux variations génétiques du *CYP1A1* peut expliquer en partie les susceptibilités interindividuelles aux cancers induits par les hydrocarbures aromatiques polycycliques mais aussi aux maladies cardiovasculaires (Shimada *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2002).

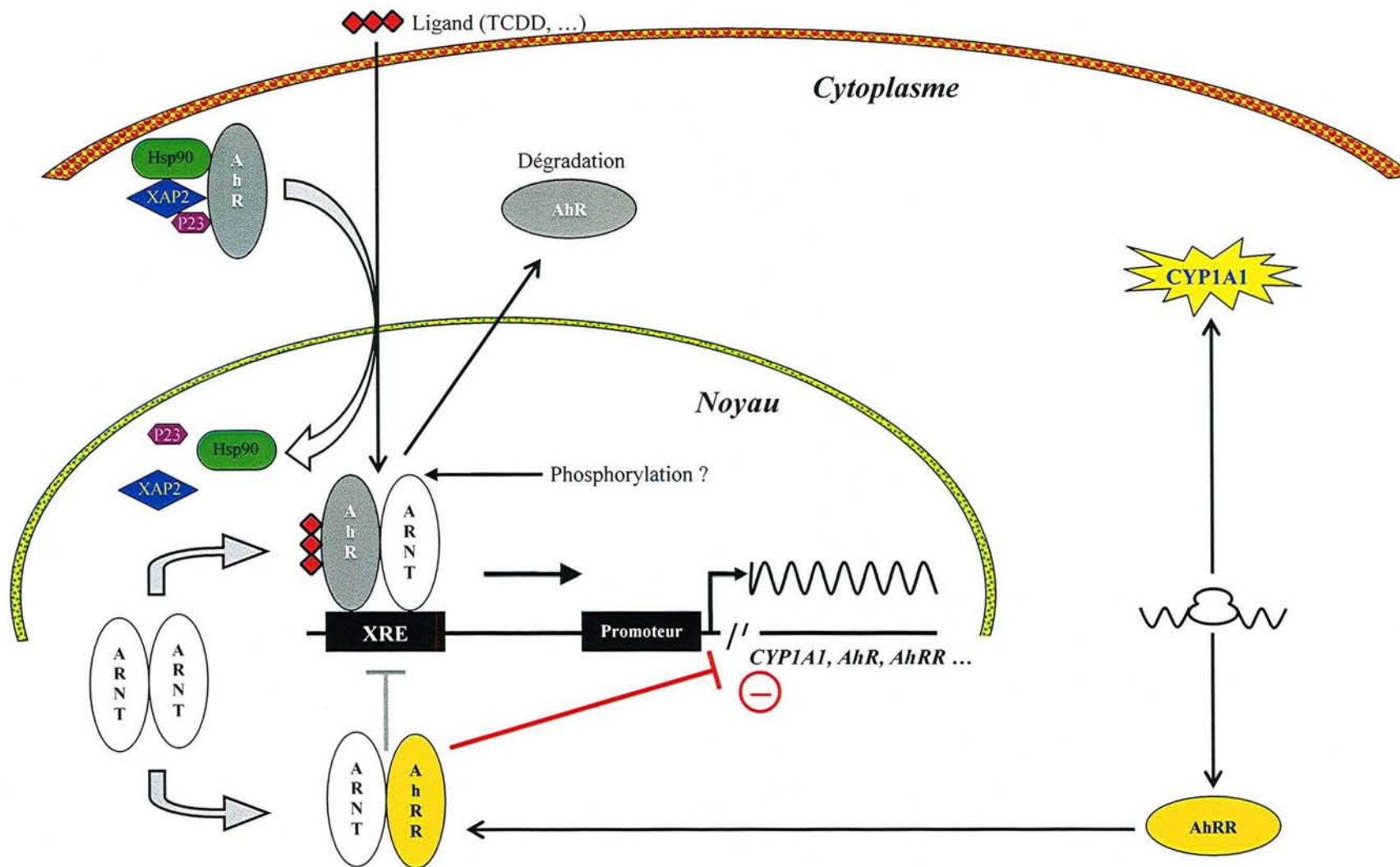


Figure 12. Mécanismes de l'activation transcriptionnelle par AhR du gène *CYP1A1* et rétrocontrôle négatif de AhR par AhRR d'après Mimura et Fujii-Kuriyama (2003). En l'absence de ligand, le récepteur AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) est présent dans le cytoplasme où il est associé à un complexe moléculaire (Hsp90, p23 et XAP2). Celui-ci est déplacé par la fixation d'un ligand (TCDD par exemple) et permet la translocation du récepteur dans le noyau. AhR se fixe sur la protéine de transfert ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator). L'hétérodimère formé se lie à l'élément de réponse XRE dans la région enhancer du gène *CYP1A1* ou *AhR* ou *AhRR* (AhR repressor). Ce mécanisme subit un rétrocontrôle négatif via AhRR, facteur de transcription qui entre en compétition avec AhR pour se lier à ARNT.

3.3.2. Régulation de CYP1A1 par AhR

Le récepteur Ah fixe un grand nombre de substrats endogènes inconnus et exogènes du CYP1A1 dont le TCDD, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et le benzo(a)pyrene (Puga *et al.*, 2005 ; Denison et Nagy, 2003). En l'absence de ligand, le récepteur Ah est présent dans le cytoplasme sous forme d'un complexe inactif avec les protéines Hsp90, XAP2 et P23, ces deux dernières jouant un rôle dans la stabilité du complexe AhR/Hsp90. Une fois le ligand fixé sur son site, le récepteur Ah migre dans le noyau et se dissocie du complexe protéique pour former un dimère avec la protéine ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator). L'hétérodimère AHR/ARNT se fixe ensuite sur l'élément de réponse (XRE) ou domaine de réponse au récepteur Ah (AhRD) situé dans la région promotrice du gène et induire celui-ci. Le récepteur Ah induit le *CYP1A1* mais aussi de nombreux autres gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose, citons comme exemples l'*UDP-glucuronosyltransférase*, la *NADPH oxydoréductase*, le *VEGF* (Vascular Endothelial Growth Factor) et l'*AhRR* (AhR Repressor) (Hankinson, 2005 ; Mandal, 2005 ; Puga, 2005 ; Mimura *et al.*, 2003 ; Thackaberry *et al.*, 2002). L'inhibiteur AhR se lie à l'ARNT pour former un hétérodimère inhibiteur et rentre en compétition avec celui de AhR/ARNT pour se fixer sur l'élément de réponse XRE (**Figures 13**). Le récepteur AhR est induit par l'exposition aux HAPs, aux nitrosamines et aux arylamines (Baba *et al.*, 2001).

Récemment, une nouvelle voie de régulation du CYP1A1 a été découverte. Elle implique les récepteurs PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) qui après formation d'un hétérodimère avec le récepteur RXR (9-cis-retinoic acid receptor), vont venir se fixer sur l'élément de réponse PPAR. Deux sites PPAR ont été identifiés dans la région promotrice du gène CYP1A1 (Fallone *et al.*, 2005). Néanmoins, cette voie parallèle ne remet pas en question l'importance du récepteur Ah dans la régulation de l'induction transcriptionnelle de CYP1A1.

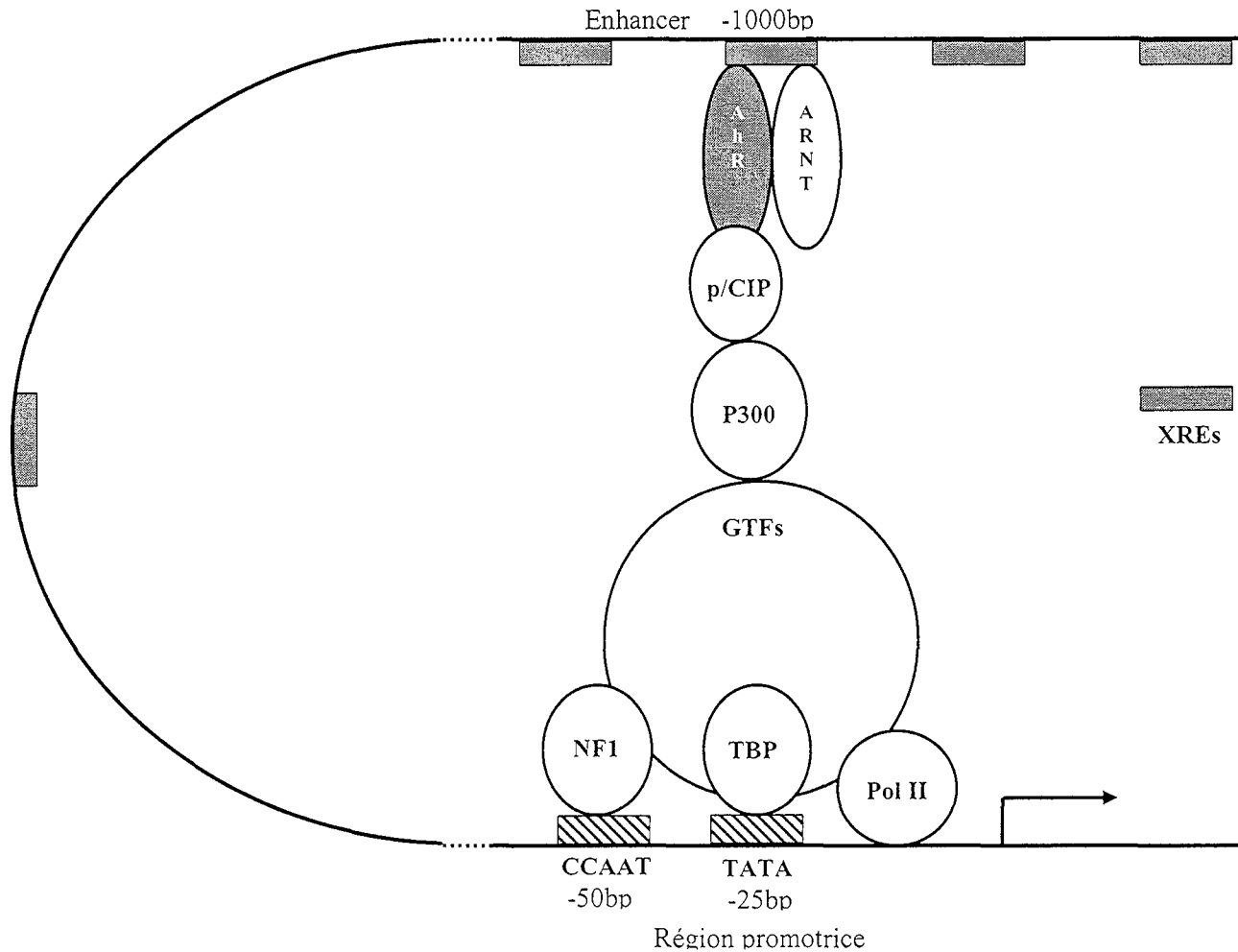


Figure 13. Hypothèse mécanistique de l'activation transcriptionnelle du gène *Cypla1* chez la souris d'après Hankinson *et al*, (2005). Fixation de l'hétérodimère AhR/ARNT sur l'élément de réponse XRE et des protéines NF1 (Nuclear Factor 1) sur la CCAAT box et TBP (TATA Binding Protein) sur la TATA box du gène *Cypla1* de la souris. Pol II (ARN Polymerase II), Fixation des coactivateurs de l'histone acétyltransférase P300 et p/CIP au niveau de l'enhancer et des Facteurs de Transcription généraux (GTFs) dans la région promotrice.

3.3.3. Polymorphismes de AhR

Le gène du récepteur *Ah*, localisé sur le chromosome 7 et constitué de 12 exons, code pour une protéine de 848 acides aminés d'un poids d'environ 96k Da (Micka *et al.*, 1997). Ce récepteur Ah présente de nombreuses variations interindividuelles et interespèces (Hahn *et al.*, 2004).

Plusieurs polymorphismes du gène *AhR* ont été décrits chez l'Homme (Okey *et al.*, 2005) (**Figure 14**). La plupart des polymorphismes étudiés sont localisés essentiellement sur l'exon 10, région impliquée dans la transactivation de plusieurs gènes, notamment celui du *CYP1A1* (Harper *et al.*, 2002).

Le gène *AhR* présente des variations interespèces (Harper *et al.*, 2002). Les polymorphismes aux codons 517 (1549C>T) et 570 (1708G>A) paraissent liés à la descendance Africaine (Wong *et al.*, 2001 ; Smart et Daly, 2000). Le polymorphisme 1661G>A, le plus étudié, concerne une substitution d'une guanine par une cytosine avec pour conséquence le remplacement d'un acide aminé, la lysine (AAA) par l'arginine (AGA) au niveau du codon 554. La fréquence allélique du polymorphisme 1661G>A est comparable dans les populations Japonaises (43%) (Kawajiri *et al.*, 1995) et Afro-Américaine (41%) (Smart et Daly, 2000) ; elle est beaucoup plus faible dans la population Caucasienne (9-12%) (Cauchi *et al.*, 2001 ; Smart et Daly, 2000).

Aucune relation n'a été mise en évidence entre le polymorphisme *AhR* codon 554 et l'activité du CYP1A1 induite par le TCDD ou le 3-méthylcholanthrene (3-MC) et les cancers pulmonaire et vésical, le micropénis ou l'endométriose (Harper *et al.*, 2002). Néanmoins, les Caucasiens porteurs d'un allèle 1661G>A, présentent une activité CYP1A1 significativement plus élevée que les sujets non porteurs de ce polymorphisme (Smart et Daly, 2000).

Chromosome Humain 7

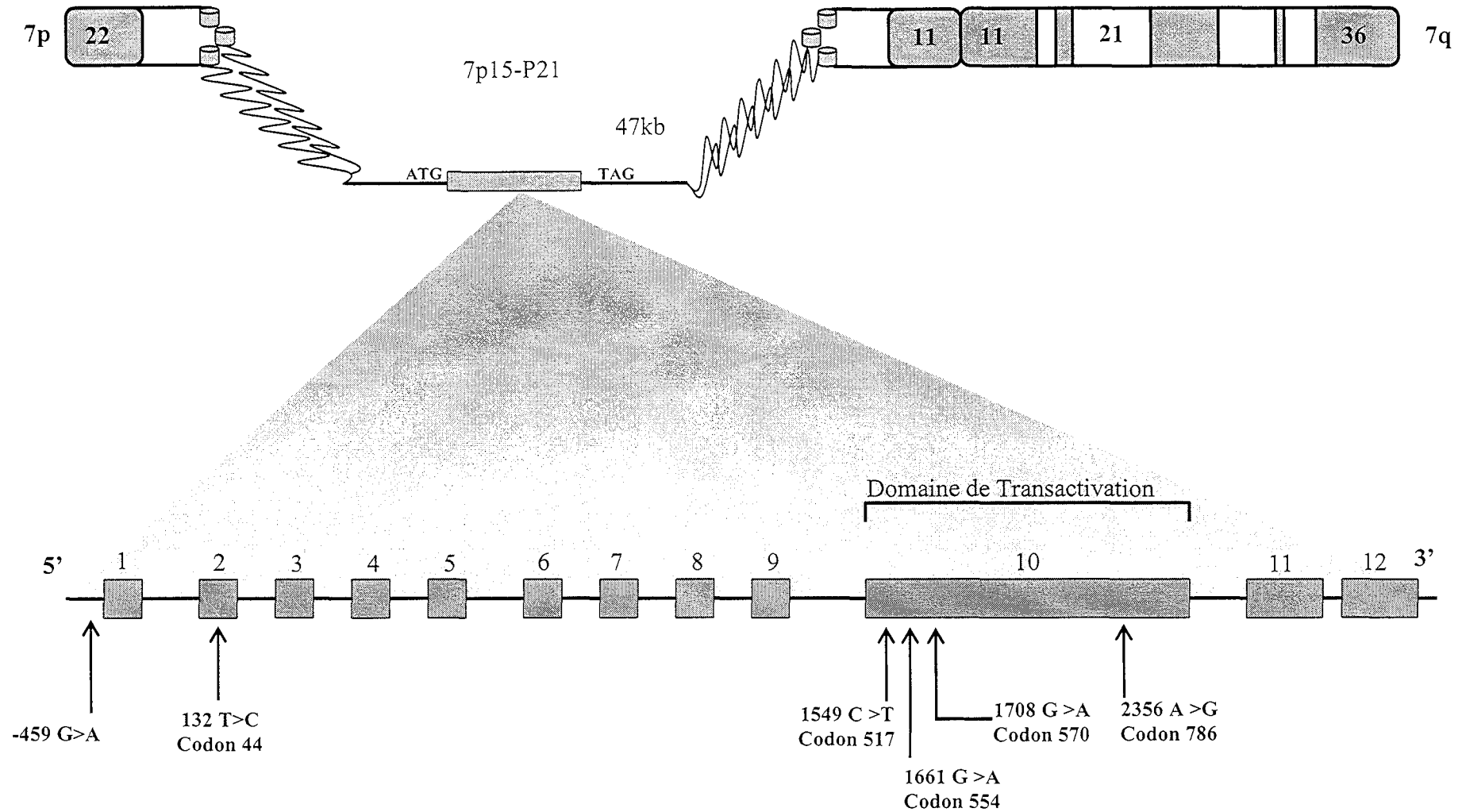


Figure 14. Principaux polymorphismes du gène *AhR* (Aryl Hydrocarbon Receptor), d'après Harper *et al*, (2002). Les exons sont symbolisés par des rectangles ou carrés gris. La nature et la position des mutations connues du gène sont précisées sur la figure.

3.4. CYP1A1, Récepteur Ah et pathologies cardiovasculaires : le polymorphisme comme moyen d'étude

3.4.1. Athérome

Le CYP1A1 est présent, principalement après induction, dans les tissus cardiovasculaires, notamment dans les cellules musculaires lisses des tissus cardiaques et artériels (Thum et Borlak, 2000 ; Zhao *et al.*, 1998) et dans les cellules endothéliales (Celandier *et al.*, 1997 ; Farin *et al.*, 1994). Le CYP1A1, après induction par les HAPs via la voie AhR, participe à la pathogenèse de l'athérosclérose en métabolisant ces mêmes HAP en dérivés athéromateux (Iwano *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2002 ; Annas *et al.*, 2000). Ces dérivés réactifs inhiberaient la transduction signalétique de LXR (Liver X Receptor) à l'origine de l'athérosclérose (**Figure 15**) (Iwano *et al.*, 2005).

Les sujets fumeurs et porteurs de l'allèle rare *CYP1A1*2A* ont un risque plus élevé de développer des maladies cardiovasculaires, notamment l'athérosclérose et les coronaropathies, ainsi qu'un diabète de type 2 facteur de risque des maladies cardiovasculaires (Wang *et al.*, 2003a ; Wang *et al.*, 2002).

Le récepteur Ah serait aussi impliqué dans l'athérosclérose (Kerzee *et al.*, 2001 ; Dalton *et al.*, 2001). La dioxine et les composés de la fumée de cigarette tel que les HAPs, accélèrent le processus d'athérosclérose via l'activation du récepteur AhR. En créant un stress oxydant AhR dépendant, la dioxine comme les HAPs, participent à l'inflammation et à l'apoptose endothéliale à l'origine de l'athérosclérose (Dalton *et al.*, 2001). Les variations interindividuelles de l'induction du CYP1A1 semblent plus se rapprocher des polymorphismes des facteurs de régulation que des polymorphismes propres au gène *CYP1A1*. Les polymorphismes jugés les plus intéressants sont ceux qui affectent l'induction de CYP1A1 par les HAPs, notamment le polymorphisme *AhR* 1661G>A (Smart et Daly, 2000).

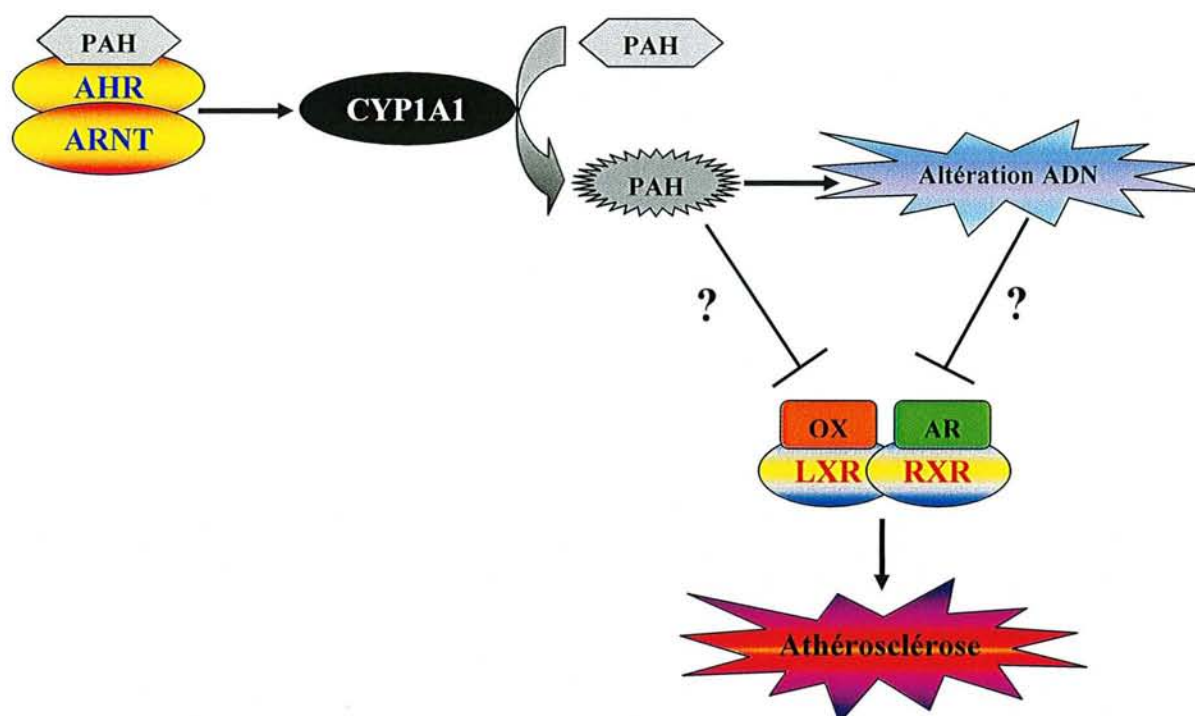


Figure 15. Processus d'athérosclérose via l'inhibition de la transduction signalétique LXR par les hydrocarbures polycycliques d'après Iwano *et al.*, (2005). HAPs, hydrocarbures aromatiques polycycliques ; AHR, aryl hydrocarbon receptor ; ARNT, AHR nuclear translocator ; CYP1A1, cytochrome P450 1A1 ; OX, oxystérols ; AR, acide rétinoïque ; LXR, liver X receptor ; RXR, retinoid X receptor.

3.4.2. Hypertension artérielle

Les fumeurs ont certaines anomalies biologiques, hémodynamiques ou des modifications de la réactivité endothéliale ou plaquettaire qui sont reconnues comme indicateurs du risque cardiovasculaire.

3.4.2.1. Chez les fumeurs

Les effets hémodynamiques de la cigarette sont connus de longue date, en particulier grâce à la coronographie au cours de laquelle il est demandé au patient de fumer. L'image montre une vasoconstriction des artères coronaires associée à une tachycardie, effets de la nicotine qui conduisent à la libération de catécholamines (Moliterno *et al.*, 1994). Paradoxalement, plusieurs études épidémiologiques mettent en évidence que les fumeurs chroniques ont en moyenne une pression artérielle égale ou plus basse que les non-fumeurs, même après ajustement sur l'âge et le poids (Okubo *et al.*, 2004 ; Janzon *et al.*, 2004 ; Primates *et al.*,

2001 ; Handa *et al.*, 1990 ; Abernathy *et al.*, 1988). Cette diminution de pression artérielle ne serait pas dépendante de la quantité de cigarettes fumées (Okubo *et al.*, 2004).

3.4.2.2. Chez les ex-fumeurs

Les données épidémiologiques montrent qu'il existe un bénéfice à arrêter de fumer. Concernant la pression artérielle chez les ex-fumeurs, les études divergent. L'arrêt du tabac ne semble pas affecter la pression artérielle du sujet (Bartholomew *et al.*, 1998) alors que certaines études épidémiologiques tendent à contredire ces résultats. En effet, l'abstinence tabagique aurait pour conséquence d'augmenter la pression artérielle chez l'homme et la femme (Okubo *et al.*, 2004 ; Janzon *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2001) et la diminuer chez la femme ménopausée (Oncken *et al.*, 2001).

3.4.2.3. Causes possibles de ces variations de tension

3.4.2.3.1. Voie autre que celle de l'acide arachidonique

L'une des premières explications serait que les sujets fumeurs ne fument pas pendant leur consultation médicale et la mesure de leur pression artérielle ne reflète alors pas la réalité (Primatesta *et al.*, 2001). La mesure ambulatoire de la pression artérielle des fumeurs versus non fumeurs, dans les conditions de vie habituelle, révèle en effet chez les fumeurs, une tension artérielle plus élevée (Mann *et al.*, 1991). L'arrêt de consommation de cigarettes se traduit par une moindre activation du système nerveux sympathique par la nicotine (Oncken *et al.*, 2001). Néanmoins, les différences de pression artérielle observées sont minimales et dépendent d'interactions multifactorielles parmi lesquels le tabac, la prise d'alcool, l'âge, l'indice de masse corporelle et les habitudes alimentaires comme la prise de café (Lee *et al.*, 2001 ; Primatesta *et al.*, 2001).

Les fumeurs ont en général un poids plus faible que celle des non fumeurs (Janzon *et al.*, 2004 ; Rasky *et al.*, 1996). L'arrêt tabagique s'associe souvent par augmentation de la quantité de nourriture ingérée, à une prise de poids, facteur de risque cardiovasculaire, (Lee *et al.*, 2001 ; Bartholomew *et al.*, 1998).

Plus de quatre mille substances sont inhalées lors de la consommation de tabac incluant divers alcaloïdes, des radicaux libres, des hydrocarbures polycycliques aromatiques et du NO (McNamara *et al.*, 2001 ; Hasday *et al.*, 1999 ; Cerami *et al.*, 1997). La toxicité de certains composés du tabac provoque des lésions des cellules endothéliales à type de mort cellulaire

(Lin *et al.*, 1992) dont l'expression clinique est la présence d'une dysfonction endothéliale (Zeihner, 1996). La fumée de cigarette est génératrice d'une quantité non négligeable de monoxyde d'azote (NO) qui peut à forte concentration, se révéler comme un précurseur de l'apoptose des cellules endothéliales (Wang *et al.*, 2003a). Malgré une inhibition de la NO synthase endothéliale, la fumée de cigarette augmente la synthèse totale de NO en activant la NO synthase inductible (Wright *et al.*, 2004). A l'arrêt du tabac, la concentration totale de NO diminue et la vasoconstriction augmente (Senthil *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2003a).

Ces toxines, une fois dans l'organisme, peuvent aussi interférer à différents niveaux avec diverses classes de biomolécules, notamment les cytochromes P450, avec pour conséquence une répercussion sur le risque cardiovasculaire (Kerzee et Ramos, 2001).

3.4.2.3.2. Voie de l'acide arachidonique

Le polymorphisme *CYP1A1*2A* ou *MspI*, corrélé à une augmentation de l'activité enzymatique et à une inductibilité plus importante (Georgiadis *et al.*, 2005), contribuerait aux variations interindividuelles de certaines pathologies cardiovasculaires, notamment l'infarctus du myocarde chez l'hypertendu (Lança *et al.*, 2003) et les pathologies coronariennes chez le fumeur, qu'il soit petit ou grand consommateur (Wang *et al.*, 2003a ; Wang *et al.*, 2002). Vu le rôle du CYP1A1 dans le métabolisme de l'acide arachidonique en métabolites vasoactifs (Roman, 2002 ; Falck *et al.*, 1990), le cytochrome P450 1A1 et plus particulièrement le polymorphisme *CYP1A1* 3801 T>C, pourrait intervenir dans la régulation de la pression artérielle (Lança *et al.*, 2003).

Comme le CYP1A1, le récepteur AhR interviendrait dans la régulation de l'homéostasie (Dalton *et al.*, 2001). En effet, l'absence de récepteur AhR chez la souris Knock Out AhR, conduit chez cette souris, à une élévation de la pression artérielle puis à une hypertrophie cardiaque (Lund *et al.*, 2003). Cette hypertrophie cardiaque s'accompagne d'une augmentation d'expression du facteur de croissance VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Thackaberry *et al.*, 2002). Les effets physiopathologiques des polymorphismes AhR sont à ce jour peu compris (Harper *et al.*, 2002). Néanmoins, l'étude chez la souris Knock Out AhR, a montré que le gène *AhR* était impliqué dans la régulation de plus de cent gènes, dont les gènes *IGF-1* (Insulin-Like Growth Factor-1) et *TGF-β* (Transforming Growth Factor-beta) (Karyala *et al.*, 2004). Les signalisations IGF-1 et TGF-β contribuent à la régulation de la pression artérielle (Kuo *et al.*, 2005 ; Dahly-Vernon *et al.*, 2005) ce qui suppose que les polymorphismes *AhR* soient impliqués dans l'hypertension artérielle.

4. Interactions entre tabac et polymorphismes des gènes impliqués dans les maladies cardiovasculaires.

4.1. *Tabac et maladies cardiovasculaires*

Le risque vasculaire majeur que représente le tabagisme est intimement lié au développement et à la complication de l'athérosclérose. L'endothélium vasculaire joue d'ailleurs un rôle clé dans l'initiation et le développement de l'athérosclérose car il constitue le passage obligatoire des fractions LDL-cholestérol et des monocytes qui sont des précurseurs des cellules spumeuses.

Les mécanismes moléculaires par lesquels la fumée de cigarette potentialise le développement de l'athérosclérose chez l'homme ne sont pas totalement élucidés. La complexité des éléments chimiques contenus dans la fumée de tabac n'y est pas étrangère car elle contient plus de quatre mille substances, incluant divers alcaloïdes, des radicaux libres, des hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAHs), des endotoxines bactériennes, du monoxyde d'azote (McNamara et Fitzgerald, 2001 ; Hasday *et al.*, 1999), et parmi lesquelles il est difficile d'identifier des responsables. Cependant, un certain nombre d'informations publiées ont permis de progresser dans la compréhension de la physiopathologie cardiovasculaire liée au tabagisme. En effet, plusieurs composés contenus dans la fumée de cigarette se sont révélés être des inducteurs et/ ou des accélérateurs de l'athérosclérose. Une fois activés, ces composés peuvent interférer à plusieurs niveaux avec différentes classes de biomolécules (Risley *et al.*, 2003).

Plusieurs polymorphismes génétiques sont à l'heure actuelle bien identifiés et leurs effets sur les risques de maladies cardiovasculaires ont fait l'objet d'un certain nombre d'études épidémiologiques.

4.2. *Gènes candidats et tabac*

Chez un individu donné, le risque cardiovasculaire est la résultante d'une composante génétique et d'une composante environnementale. L'étude de l'interaction entre ces composantes doit permettre de mieux comprendre l'origine de ce risque afin de susciter des mesures préventives. Le nombre important de gènes pouvant être impliqués dans les pathologies cardiovasculaires, la grande fréquence et l'impact individuel faible des allèles de prédisposition ainsi que l'effet de certains facteurs d'environnement, imposent une approche

complexe. Le tabac est un facteur environnemental qui se comporte comme un modulateur de réponse. A niveau égal de consommation de tabac, certains fumeurs développeront des pathologies cardiovasculaires et d'autres n'en seront jamais atteints. Des facteurs génétiques pourraient expliquer cette différence de risque vis-à-vis de l'exposition au tabac. Différents polymorphismes peuvent avoir des effets très divers sur les différents phénotypes qui sont affectés par le fait de fumer (Wang *et al.*, 2003a) (**Figure 16**).

Nous décrivons ci-après plusieurs gènes candidats dont les interactions polymorphismes tabac influencent le risque cardiovasculaire.

○ **Apolipoprotéine E**

Dans le plasma, les lipides tels que le cholestérol et les triglycérides sont liés à diverses protéines, les apolipoprotéines, pour former des vésicules lipoprotéiques. Les LDL (low-density lipoprotein), en particulier les plus petites, peuvent pénétrer la paroi des artères. Le tabac est connu pour augmenter la peroxydation lipidique (Heitzer *et al.*, 1996). L'accumulation de LDL oxydées dans la paroi vasculaire de l'intima est l'un des plus importants mécanismes du dysfonctionnement endothélial et de l'athérosclérose (Steinberg *et al.*, 1989).

L'apolipoprotéine E (ApoE), synthétisée dans le foie et l'intestin, est associée aux lipoprotéines riches en triglycérides. L'apoE comprend 3 allèles ; l'apoE3, la plus abondante, qui a une cystéine en position 112 et une arginine en position 158. L'apoE4 qui a une arginine aux deux positions et l'apoE2 qui a une cystéine aux deux positions. Ces allèles ont des affinités différentes pour les récepteurs aux LDL. Pour le polymorphisme commun du gène de l'*APOE* (codon112/158), les allèles $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ sont associés à une augmentation du risque de coronaropathie et d'accidents vasculaires cérébraux alors que l'allèle $\epsilon 2$ est plutôt protecteur (McCarron *et al.*, 1999). En fonction des génotypes, il est observé chez les individus des variations du LDL-cholestérol et de l'ApoB significativement différentes (Haddy *et al.*, 2002 ; Pallaud *et al.*, 2001). Les sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 2$ ont en moyenne des taux de cholestérol 10% plus faibles que les sujets homozygotes $\epsilon 3$ alors que les sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ ont des taux 5% plus élevés que les homozygotes $\epsilon 3$. *In vitro*, l'effet antioxydant varie en fonction du génotype avec un effet plus marqué pour l'ApoE2 que l'ApoE3 et plus faible pour l'ApoE4 (Humphries *et al.*, 2001).

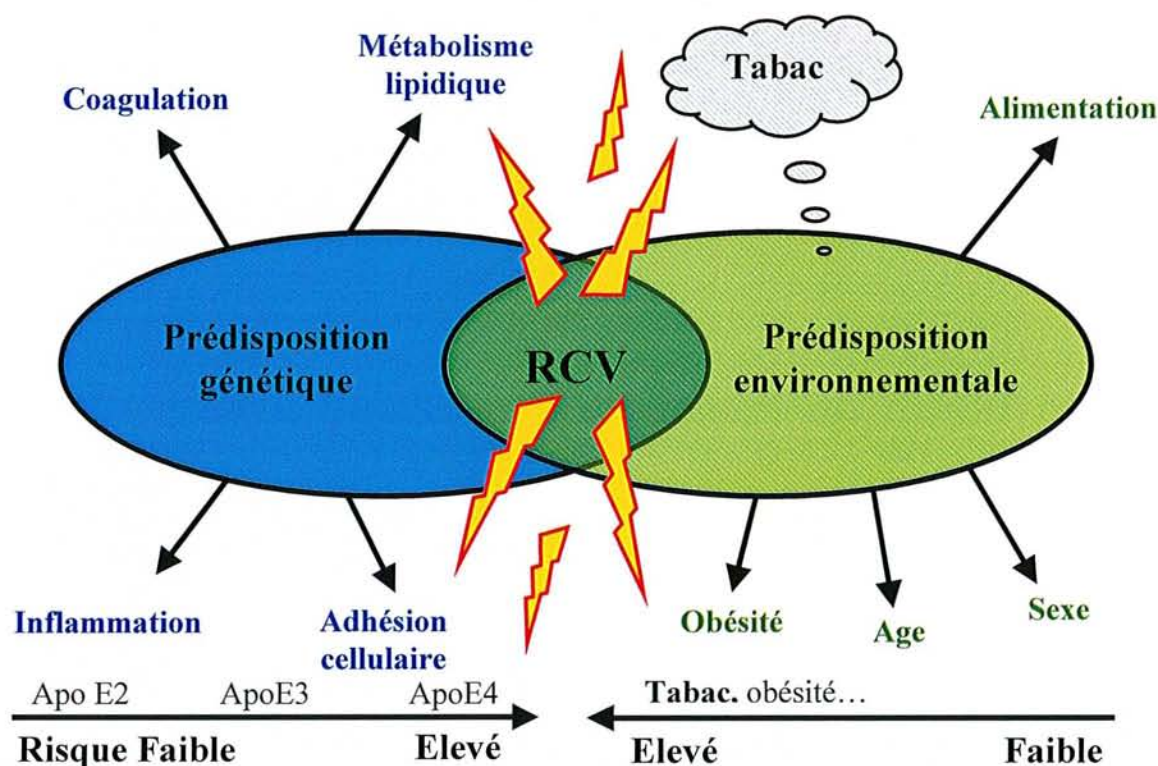


Figure 16. Modèle d'interaction gène-environnement. RCV : risques cardiovasculaires

D'un point de vue physiopathologique, cela se traduit par des concentrations plus élevées de LDL oxydées chez les sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ et une plus grande accumulation de cholestérol dans les plaques d'athérome, d'où un risque plus élevé de coronaropathie (Cullen, 2000).

Le tabac est associé à une augmentation du risque de coronaropathie mais l'interaction tabac polymorphismes de l'ApoE modifie sensiblement ce risque. Les sujets fumeurs porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ ont un risque plus élevé de coronaropathie que les sujets possédant les allèles $\epsilon 3$ et $\epsilon 2$ respectivement. Néanmoins, ce risque chute chez les ex-fumeurs génotypés $\epsilon 4$, confirmant les effets bénéfiques de l'arrêt du tabac (Talmud *et al.*, 2005 ; Keavney *et al.*, 2003).

○ Paraoxonase

La paraoxonase 1 est une glycoprotéine calcium dépendant associée aux HDL (high-density lipoprotein). Cette enzyme prévient l'oxydation des LDL et participerait au développement de l'athérosclérose (Mackness *et al.*, 1998). En effet, les souris KO (knock-out) *Pon1* présentent des concentrations sériques plus élevées de LDL oxydées et développent plus rapidement les lésions athérosclérotiques (Shih *et al.*, 1998). Le tabac est un facteur de risque de coronaropathie. Fumer aurait des effets néfastes sur la paraoxonase en diminuant directement

son activité enzymatique avec pour conséquence une augmentation de l'oxydation lipidique. Deux polymorphismes dans la région codante du gène *PON1*, L55M et Q192R, sont décrits comme ayant des conséquences fonctionnelles sur l'activité de la protéine. Les sujets porteurs de l'allèle muté *PON1*₁₉₂ semblent présenter une activité enzymatique diminuée alors que les sujets porteurs de l'allèle rare *PON1*₅₅ ont une activité paraoxonase augmentée. Le polymorphisme Q192R est associé à une augmentation du risque d'angor instable (Mashiba *et al.*, 2005) et d'infarctus du myocarde uniquement chez le non fumeur, paradoxalement, cette relation n'est pas retrouvée chez les fumeurs (Sen-Banerjee *et al.*, 2000). Néanmoins, le polymorphisme L55M est associé à une diminution des lésions athérosclérotiques alors que chez le fumeur, aucune interaction n'est observée (Rontu *et al.*, 2003). Nous avons ici un exemple type de l'interaction tabac et polymorphismes.

○ **Lipase lipoprotéique**

La lipase lipoprotéique (LPL) exerce une activité enzymatique importante dans le métabolisme des lipides. La LPL hydrolyse les particules riches en triglycérides dans le muscle, les tissus adipeux et les macrophages et génère des acides gras et glycérols pour le stockage et la synthèse d'énergie (Talmud *et al.*, 2002). Deux polymorphismes sont décrits pour le gène *LPL*, le premier, D9N correspond à une substitution de l'acide aspartique par l'asparagine sur le codon 9 et le deuxième, N291S, avec la substitution d'une asparagine par une sérine. Les deux polymorphismes sont associés à une augmentation des triglycérides plasmatiques (Talmud *et al.*, 2000). Les sujets porteurs de l'une des mutations seraient retrouvés plus fréquemment dans le groupe des patients souffrant d'une pathologie coronarienne (Talmud *et al.*, 2002). Chez les fumeurs, le risque de coronaropathie est augmenté pour les sujets porteurs de l'allèle muté *D9N* (Fisher *et al.*, 1997). Le mécanisme proposé serait une plus haute affinité du phénotype LPL-D9N pour les LDL oxydées et plus particulièrement au niveau de l'endothélium endommagé par les constituants du tabac conduisant à une accumulation de LPL (Cullen *et al.*, 2000).

○ **NO synthase**

La NO synthase, enzyme codée par le gène *NOS3*, est particulièrement présente dans l'endothélium et en moindre quantité dans les plaquettes (Christopherson et Bredt, 1997). La fumée de cigarette est génératrice d'une quantité non négligeable de monoxyde d'azote (NO).

Présenté comme un inhibiteur de l'apoptose dans les situations de stress oxydatif (Hermann *et al.*, 1997), le NO à forte concentration peut se révéler comme un précurseur de l'apoptose des cellules endothéliales (Wang *et al.*, 2003a). Malgré une inhibition de la NO synthase endothéliale (eNOS), la fumée de cigarette augmente la synthèse totale de NO en activant la NO synthase inductible (Wright *et al.*, 2004). A l'arrêt du tabac, la concentration basale de NO diminue et prédispose les individus à l'hypertension, aux thromboses et augmente le risque d'infarctus du myocarde. Ce risque cardiovasculaire est augmenté chez les sujets porteurs de l'allèle muté au niveau de l'intron 4 de la NO synthase endothéliale (Senthil *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2003a). Sans autre facteur de risque, le polymorphisme eNOS intron 4a/b n'est pas associé aux maladies cardiovasculaires, mais croisé au tabac, ce polymorphisme est associé aux coronaropathies (Matyar *et al.*, 2005).

○ **p53**

La protéine p53 est un facteur nucléaire impliqué dans l'apoptose. Plusieurs polymorphismes du gène *p53* sont décrits et associés à une augmentation du risque de survenue de cancers. Le gène *p53* sous l'influence de la fumée de cigarette, subit des altérations ou variations génétiques qui pourraient aggraver les pathologies cardiovasculaires (Wang et Wang, 2005 ; Wang *et al.*, 2003a).

○ **Récepteurs aux endotoxines CD14**

Plusieurs endotoxines se présentent comme des précurseurs de l'inflammation lors de l'athérosclérose. Les fumeurs ont des concentrations plasmatiques élevées d'endotoxines (Wiedermann *et al.*, 1999). Les récepteurs solubles aux endotoxines CD14 participent à la neutralisation de ces endotoxines plasmatiques et temporiseraient l'inflammation d'origine tabagique lors de l'athérosclérose. Le polymorphisme C-159T dans la région promotrice du gène *CD14* est associé à des taux faibles de récepteurs solubles aux endotoxines et à un épaississement de l'artère coronaire chez le fumeur, signes précurseurs de l'athérosclérose (Risley *et al.*, 2003).

○ Interleukine-6

La fumée de cigarette induit une réponse inflammatoire complexe qui varie en fonction des polymorphismes des gènes de l'inflammation (Rosner *et al.*, 2005 ; Nordskog *et al.*, 2003). L'inflammation est une composante clé de l'athérosclérose et les gènes codant pour des cytokines proinflammatoires sont des gènes candidats au risque de coronaropathie. L'interleukine-6 (IL-6) qui est synthétisée par différents types de cellules, comme les fibroblastes, les monocytes, les adipocytes et les cellules endothéliales, participe activement à la réponse inflammatoire (Heinrich *et al.*, 1990). IL-6 participe au dysfonctionnement endothélial, à la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et à la migration des leucocytes, étapes qui conduisent à la formation de la plaque d'athérome et à son instabilité (Ridker *et al.*, 2000 ; Gabriel *et al.*, 2000). 3 variants sont identifiés dans la région promotrice du gène *IL-6*, parmi lesquels figure le polymorphisme G-174C qui semble être associé à des taux plus élevés d'IL-6 (Fishman *et al.*, 1998). Chez les fumeurs, les taux plasmatiques d'IL-6 sont significativement plus élevés que chez les non-fumeurs et en présence de ce polymorphisme, ces taux augmentent. L'interaction tabac et polymorphisme G-174C est associée à un risque beaucoup plus élevé de coronaropathie chez les sujets porteurs de l'allèle muté que chez les sujets non porteurs (Stephens et Humphries, 2003).

○ Métalloprotéinases

La fumée de cigarette agit directement ou indirectement sur de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme du collagène (Raveendran *et al.*, 2004) et sur les métalloprotéinases matricielles qui participent au développement de l'athérosclérose (Nordskog *et al.*, 2004 ; Morozumi *et al.*, 2004). Les métalloprotéinases matricielles de type 3 (MMP3) ainsi que leurs inhibiteurs endogènes (TIMP-1) régulent l'accumulation de matrice extracellulaire lors des lésions vasculaires et donc de la synthèse de la plaque d'athérome (Newby *et al.*, 1994). Deux variants, 5A et 6A, sont décrits dans la région promotrice du gène *MMP3* (Ye *et al.*, 1996). Les sujets homozygotes pour l'allèle 6A auraient des concentrations plus faibles de stromelysine dans leur paroi artérielle par diminution de la transcription génétique. La faible activité protéolytique résultante devrait augmenter la matrice extracellulaire et conduire à un développement plus rapide des plaques d'athérome. Cependant, aucune étude n'a montré de relation entre cet allèle 6A et le risque d'accidents vasculaires (Humphries et Morgan, 2004) contrairement à l'allèle 5A très exprimé et associé à

un risque élevé d'infarctus du myocarde, particulièrement chez les fumeurs. Ce risque chute après arrêt du tabac (Liu *et al.*, 2005 ; Humphries *et al.*, 2002).

○ **Glutathion S-transférase**

Les glutathion S-transférases (GST) participent au métabolisme des xénobiotiques (carcinogènes chimiques, médicaments, polluants) et des endobiotes (produits du stress oxydant). Ces enzymes dimériques sont impliquées dans la conjugaison de composés électrophiles nocifs au glutathion, la cancérogenèse et la chimiorésistance aux anticancéreux, mais restent peu étudiées dans les pathologies cardiovasculaires (Hayes et Prellford, 1995). Les GSTs forment une super-famille d'isoenzymes polymorphes subdivisés en 7 classes : mu (GSTM), alpha (GSTA), pi (GSTP1), thêta (GSTT), zêta (GSTZ), sigma (GSTS) et kappa (GSTK) (Habdous *et al.*, 2002). Ces différents polymorphismes sont associés au risque de survenue de cancers par exposition aux carcinogènes chimiques. Les sujets fumeurs porteurs de l'allèle nul *GSTM1*0* semblent avoir un risque plus élevé de développer un cancer des poumons (Stücker *et al.*, 1999), de la vessie et du larynx (D'errico *et al.*, 1999). Des travaux relatifs à l'incidence des polymorphismes de la GST sur le risque de survenue de pathologies cardiovasculaires ont été récemment publiés (Doney *et al.*, 2005 ; Habdous *et al.*, 2004). Li *et al.*, (2000) montrent une association significative entre la survenue de coronaropathies chez les sujets fumeurs homozygotes pour la délétion du gène *GSTM1* par rapport aux sujets fumeurs exprimant la protéine GSTM1. En revanche, ce risque est 3 à 4 fois plus élevé chez les patients fumeurs exprimant la GSTT1 comparé aux sujets fumeurs ayant l'allèle nul GSTT1*0. La diminution du risque chez les patients fumeurs exprimant la GSTM1 serait due au rôle protecteur exercé par cette protéine alors que l'augmentation du risque chez les fumeurs exprimant la GSTT1 serait, quant à lui, intimement liée au rôle de bioactivation de substrats GSTT1-dépendant. Aucune association n'a été démontrée entre les polymorphismes *GSTM1* et *GSTT1* et les accidents vasculaires cérébraux (Um *et al.*, 2006).

○ **Enzyme de conversion de l'angiotensinogène**

Le système rénine angiotensine participe activement à la régulation de l'homéostasie vasculaire. L'enzyme de conversion (ACE) est l'un des maillons forts de ce système. La délétion d'un allèle du gène de l'ACE est associée au risque d'accident vasculaire cérébral et peut s'expliquer par des concentrations plasmatique et tissulaire plus faibles en enzyme de conversion de l'angiotensinogène. Les fumeurs porteurs d'allèles mutés du gène de l'ACE ont

un risque plus élevé de décéder plus rapidement que les sujets ne possédant pas l'allèle muté (Arias-Vasquez *et al.*, 2005 ; Sobstyl *et al.*, 2002). L'interaction des polymorphismes M235T du gène *AGT* (angiotensinogène), A1166C du gène *AGTRI* (récepteur 1 de l'angiotensinogène) et du gène *ACE* n'augmente pas, même chez les fumeurs, le risque d'infarctus du myocarde (Araujo *et al.*, 2005).

○ Facteurs de la coagulation

Le tabac est un puissant facteur thrombogène lié à la fois à l'augmentation de la viscosité sanguine due à l'augmentation des éléments figurés du sang, à l'augmentation du taux de fibrinogène (Kannel *et al.*, 1987) et à l'augmentation de l'agrégation et de l'adhésivité plaquettaire (Hioki *et al.*, 2001). L'ensemble augmente le risque d'accidents aigus de thrombose, manifestation principale des complications vasculaires du tabagisme. La mutation Arg506Gln du facteur V (Leiden) et le polymorphisme G20210A du gène de la prothrombine sont des facteurs de risque de la thrombose veineuse (Endler et Mannhalter, 2003). Le tabac accentue ce risque, les femmes fumeuses porteuses de la mutation du facteur V ont des risques plus élevés d'infarctus précoce du myocarde (Tanis *et al.*, 2003) et d'accident vasculaire cérébral après 60 ans (Lalouschek *et al.*, 2005).

Les estrogènes, présentés comme cardioprotecteurs, et le tabac connu pour ses effets anti-estrogènes, modifient les taux circulants de lipoprotéines athérogènes. Le tabac est un facteur de risque cardiovasculaire important chez les femmes pré ou post ménopausées. Le risque d'infarctus du myocarde ou d'ischémie cardiaque est aggravé chez les femmes fumant beaucoup et porteuses de l'allèle muté des récepteurs alpha aux estrogènes (Shearman *et al.*, 2005).

Pour plusieurs polymorphismes, les données épidémiologiques sont insuffisantes, contradictoires ou bien encore inexistantes. Les études permettant d'établir l'existence possible d'un effet modulateur des polymorphismes génétiques dans la relation maladies cardiovasculaires-exposition au tabac semblent relativement peu nombreuses et possèdent des échantillons de population de taille insuffisante pour garantir une puissance statistique suffisante.

En conclusion, des associations entre certains polymorphismes génétiques et la survenue de maladies cardiovasculaires liées au tabac ont été mises en évidence. Le tabac interagit avec de nombreux gènes candidats des maladies cardiovasculaires. Parmi ces facteurs génétiques, la famille des gènes cytochromes P450, notamment le gène *CYP1A1* qui code pour des enzymes qui sont principalement impliquées dans la détoxification de composés présents dans la fumée de cigarette (Kerzee et Ramos, 2001).

Matériel et Méthodes

1. POPULATION ETUDIEE

1.1. LA COHORTE STANISLAS

La Cohorte STANISLAS (Suivi Temporaire Annuel Non Invasif de la Santé des Lorrains Assurés Sociaux) est une cohorte familiale recrutée entre 1993 et 1995 et constituée de 1006 familles de Meurthe et Moselle et des Vosges, soit 4295 personnes. Chaque sujet inclus dans cette cohorte descend d'au moins deux générations caucasienne et de nationalité française. Les familles, supposées saines (notamment au niveau cardiovasculaire, hépatique et rénal), sont composées chacune de deux parents et d'au moins deux enfants biologiques âgés de plus de huit ans se rendant régulièrement au Centre de Médecine Préventive, Vandoeuvre-lès-Nancy, France pour y effectuer un bilan biologique complet (Siest *et al.*, 1998). La population pour la présente étude est constituée d'un échantillon de 463 sujets adultes issus de familles comportant au moins un adulte fumeur. Les prélèvements au premier point (t_0) ont été obtenus entre 1993 et 1995 et au second point (t_{+5}) entre mai 1998 et juin 2001. Cette étude a été approuvée par le Comité Ethique Local de Lorraine et les consentements des personnes ont été recueillis lors du recrutement.

1.2. Données utilisées et exploitées dans le cadre de ce travail

De nombreuses informations, données biologiques, physiologiques ou concernant le comportement et l'environnement ont été recueillies auprès de chacun des membres des familles de la Cohorte STANISLAS. Parmi toutes ces informations, les données suivantes ont été utilisées et exploitées dans le cadre de ce travail :

Données générales..... Sexe, âge, bilan lipidique, filiation

Mesures morphologiques..... Poids, taille, indice pondéral (IMC = indice de masse corporelle = poids/taille²)

Habitudes de vie..... Consommation de tabac (en nombre de cigarettes par jour), d'alcool (en gramme par jour), prise de médicaments.

Examen clinique..... Tension artérielle

• Définitions des sous-groupes dans la population étudiée

La population est séparée en trois groupes :

- **Les non-fumeurs** : ce sont les personnes qui n'ont jamais fumé dans leur vie.
- **Les fumeurs** : est considéré comme fumeur, toute personne qui fume régulièrement depuis au moins trois mois et a cessé éventuellement de fumer depuis moins d'un an.
- **Les anciens fumeurs** : ce sont les fumeurs qui ont cessé de fumer depuis au moins un an avant de commencer l'étude.

A l'aide d'un questionnaire standardisé, les fumeurs et anciens fumeurs ont indiqué le nombre moyen de cigarettes fumées par jour ou qu'ils fumaient par jour. Aucun fumeur occasionnel et femmes enceintes n'ont été inclus dans l'étude.

- ***Mesure de la pression artérielle (PA)***

La mesure de la pression artérielle (systolique et diastolique) est prise au bras gauche en position couchée, après 5 minutes de repos. La mesure est répétée 3 fois avec un sphygmomanomètre. Les brassards de taille 12 × 26 cm sont utilisés dans cette population composée d'adultes.

- ***Nombre d'échantillons***

L'étude statistique du CYP2A6 a été réalisée sur 463 sujets dont 226 hommes et 237 femmes et celle du CYP1A1 et AHR sur 613 sujets dont 302 hommes et 311 femmes.

2. METHODOLOGIE

2.1. PRELEVEMENTS DE SANG

Les sujets sont à jeun depuis 12 heures. Le prélèvement de sang est effectué par ponction à la veine du pli du coude, chez ces sujets en position allongée, dans deux tubes de 10ml prélevé sur EDTA.

2.1.1. ECHANTILLONS D'ADN

L'ADN génomique est extrait, à partir de « buffy coat » congelé à -196°C , par la méthode de « salting out » proposée par Miller *et al.*, 1988. Le « buffy coat », fraction grossièrement purifiée de cellules nucléées, est obtenu par centrifugation (1000g à température ambiante pendant 10min) du sang total frais prélevé sur EDTA.

2.2. GENOTYPAGE DU CYTOCHROME P4502A6 PAR LA METHODE PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*)

2.2.1. Principe

Après amplification de l'ADN génomique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), la détection des mutations est réalisée par digestion enzymatique du fragment amplifié à l'aide d'une endonucléase qui reconnaît un site de restriction spécifique portant ou non la mutation à détecter. La digestion du produit amplifié génère des fragments de tailles différentes visualisés en lumière UV après migration sur gel de polyacrylamide et incorporation de bromure d'éthidium.

2.2.2. Protocole

- Conditions d'amplification par PCR du fragment contenant ou non l'allèle muté.

Oligonucléotides spécifiques

Sens 5' CAC CGA AGT GTT CCC TAT GCT G 3'

Antisens 5' TGT AAA ATG GGC ATG AAC GCC C 3'

La taille théorique du fragment à amplifier est de 1322 pb (Figure 17)

Mélange réactionnel pour un échantillon

Tampon PCR	1X
dNTPs	200 µM
Oligonucléotide sens	0,20 µM
Oligonucléotide antisens	0,20 µM
ADN génomique	150 ng
Taq polymérase	1 U
Volume réactionnel	50 µl

Conditions d'amplification

Dénaturation avant ajout de la Taq polymérase à 95°C pendant 5 min

Amplification

1 min à 94°C	Dénaturation du double brin
1 min à 63°C	Hybridation des amorces
2 min à 72°C	Elongation des amorces
35 cycles suivis d'une étape d'élongation de 10 min à 72°C	

Gène *CYP2A6*1A* ou **1B* 5'-ATGTGATGC TATACTAAGC TGTTTTACGT GAGGAATAGG
 TGCTTTTAA GAATCTGTCT AGAAGGCTAT GGGCACAGAT CTGTGTTCAA AGATTTTCTG
 GGCACCTATG TTTTGTGAGA CATCAGAGAC AACTTTCTAA GCCTCAGTTT TGTCACGTGT
 AAAATGGGCA TGAACGCCCT TCGCAGAGGT TTGTGGCAAT TAGGTGAGCG TGCAATGGTT
 TTTGAACAAA GGTGACACGG GGTACGTGC TCAGGAAATA AGAGCTGCTA TTATTACTAC
 TCTTCATAGC ATAATGTAAG GGTTCCTTC CTCTCATCCC AGCTCGGAAG CACCTTATCA
 AGGTGAACTG AGCCGCTTCT GTTCTTCTC TTCCTCTAG CCACCAC

*CYP2A6*1A* GGGGCTTCTC
*CYP2A6*1B* GGGGCTTCTC

TTGCGGCAATC GTGCGGCAAG TTTTAGCTGC GGGGCTTCTC CAAGGCGGGT GTTGGGCTTG CCG
 TTGCGGCAATC TTGCGGCAAT TCTTATACCG GCTCTTCTC GAAAGCGGGT CCGTACCGCG CC. TTTCC

TGGCCCCGCC CACCAGACCT GCACCGGCACAGC CCTCGCTCAGC GGGGCAGGAA
 GCTCATGGTG TAGTTTCGTG GGATCGTGGC AAAGCCCACG TGTTTGGGGG ACACGTCAAT
 GTCCTTAGGT GACTGGGAGG ACTTGAGGCG GAAGTTCTGC ATGACGGTGG TGAAGAAGAG
 AAAGAGAAAG AGCTCCATTC TGGCCAGGCC TTCTCCGAAA CAGTTCCGC TTCTCTG
 AGGAGGAGAG GCGGGAGGGG TGGAGGTGAA GCCACTCTC AGTGCAGCCT CGCCCCAGTA
 CCGACCTCCA GCTGCGGCTC TCCAGGGAG GAAGGGTGGA ATATTATGGC CTGAGAGAGT
 TTCAGAGGAG GCTCTGATCC TCCCTGAGCC TCAATTCTT TCTATAAGAG ATGTAACAAT
 GGTGAACCAA TATTGATATA TTATTACTAA CAAAGTCCAT AGTTTACATT AGGGTTTACT
 CTGTGTTATA CAGTTCTATG GGTTTTGAAA AAGGCATAAT GTCACACATC CATCATAGAT
 GGGGTGATCC ATGCCAGGTG TAGCAATGGG AGGTTTAGAT GTCCTTCTC GCCAGGTACA
 CTTGCAAATA TGAAGTGTGT GCCGTCATCT CCTTTTAGG GATCTGAGGA ATCTGCTGTG
 TGACCCTAGA GAAATACATC TACGGGGAAA GATGTTTCTT TTCATTTTAC CTGGGCGCAG
 GTACTGGGTG CTGGGTAGTT AAGGAAGTAT CAGCTGCTGG CTCAAGGGTA GATTCTAACA
 GGAACCTCCA AGCTGGAGAA ATACCAGGCT ACACCGCAGA GAGGGGAGGA GGGTGAGGGA
 GGCCCCTGCT GGTGTGAGCC GTGGCCTGGC AGCAAACAGT GGTCTCTTAC CGATGGAAAA
 GGGCACAAAA GCATCACTCT TCTTAACTG CCCCTTCTCA TTCAGGAAGT GCTGGGGATT
 GAAGTCCTGG GGGTTGGAGA AGAACTGGG GTCTCTCAGC ACAGAGCCCA GCATAGGGAA
CACTTCGGTG CCCTGGTAGG GAGGAGGAAG TTGTGTGTGA TGAGGAGGGT CGGGGGATTG
 GTGAAAGTAC ACAGGGGCTG GAGGGGGAAC TAGTGTGCCC CAGGTAAGGG GAAGTGGCAG
 GCATGGAGGA GTTGGGGTCC TCTGATGGAG GAGCTTTGGG GGATAGAAGG TTCACATCTC
 TGAAACAGGA AGTTTGGGAG ACATGGGGTC CATGTCCTTC TAGGCAGGAG TTTGGGGGAC
 CTGAGATTC TGTCCCTATG ACAAAGGCC GAATGGAAAG - 3'

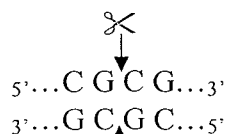
Figure 17 : Génotypage du *CYP2A6*1B* par RFLP. ADN génomique de *CYP2A6* (exon 8, exon 9 et partie non traduite) avec sites de fixation des amorces (bases grisées) pour génotyper le *CYP2A6*1B* et *CYP2A6*4A* (d'après Ariyoshi *et al.*, 2000).
 « TGTAATGGGCAATGAACGCC » : Amorce spécifique de *CYP2A6* (se fixe sur *CYP2A6* dans la région 3' flanquante) ; « CAGCATAGGGAACTTCGGTG » : Amorce non spécifique de *CYP2A6* (se fixe sur l'exon 8 du gène *CYP2A6* et *CYP2A7*) ; Fragment amplifié de 1322 pb ;  Site de coupure par l'enzyme *Eco81I* ;  Site de coupure par l'enzyme *Bsh1236I*.

- **Digestion enzymatique**

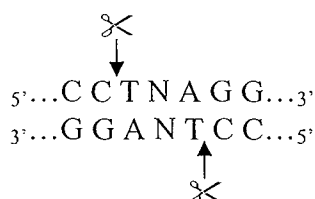
Digestion, dans 2 tubes différents, de 16 µl de produits de PCR par 3 unités de *Bsh1236I* (*FnuDII*) ou 3 unités de *Eco81I* (*SauI*) pendant 16 heures.

Les sites de restrictions sont les suivants :

✓ *Bsh1236I* :



✓ *Eco81I* :



Fragments obtenus après digestion par *Bsh1236I* en fonction du phénotype (**Figure 17**) :

CYP2A6*1A :	1322 pb	} La différenciation n'est pas possible
CYP2A6*1B :	1041 et 280 pb	
CYP2A6*4A :	1040 et 280 pb	

Fragments obtenus après digestion par *Eco81I* en fonction du phénotype (**Figure 17**) :

CYP2A6*1A :	789 et 429 pb
CYP2A6*1B :	789 et 428 pb
CYP2A6*4A :	728 et 428 pb

- **Migration** sur gel de polyacrylamide à 8%, 90 volts pendant 5 min puis 150 volts pendant 75 min dans du tampon TBE 1X.

Préparation du gel de polyacrylamide à 8%

Acrylamide 30%	1.6 ml
Eau distillée	4.1 ml
Tampon TAE 10X	600 µl
Persulfate d'ammonium 10%	60 µL
Temed	6 µl

2.2.3. Matériels et réactifs

Matériels :

- Appareil PCR : DNA Thermo cycler : i Cycler de chez Bio-Rad
- Matériel d'électrophorèse : Power/Pac 300 marque Bio-Rad

Réactifs :

- PCR (volume réactionnel final 50µl) :Taq DNA Polymerase Roche, Tampon Mg^{2+} 10X Roche, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) Roche, amorces de chez Invitrogen.
- Digestion enzymatique par *Bsh1236I* (*AccII* ou *FnuDII*) lot 1511 et *Eco8II* (*SauI*) lot 1141, 10U par µl pour chaque produit, MBI Fermentas.
- Gel d'acrylamide 8% : Tris.acetate.EDTA buffer Sigma, Acrylamide/bis-acrylamide solution à 40% Sigma, TEMED Bioprobe, Persulfate d'ammonium 10% Appligene, bleu de dépôt Sigma, Marqueur de taille Promega 100bp, Bromure d'éthidium 10mg/ml Sigma.

La méthode de génotypage selon Ariyoshi *et al.*, 2000 pour distinguer les polymorphismes *CYP2A6*1B* et *CYP2A6*4A*, est une technique de RFLP qui se déroule en trois phases (**Figure 18 et 19**) : PCR, double digestion enzymatique et migration sur gel de polyacrylamide. Au vu du nombre important d'échantillons, les produits de PCR digérés séparément ont été déposés dans le même puits pour la migration sur gel (**Figure 20**).

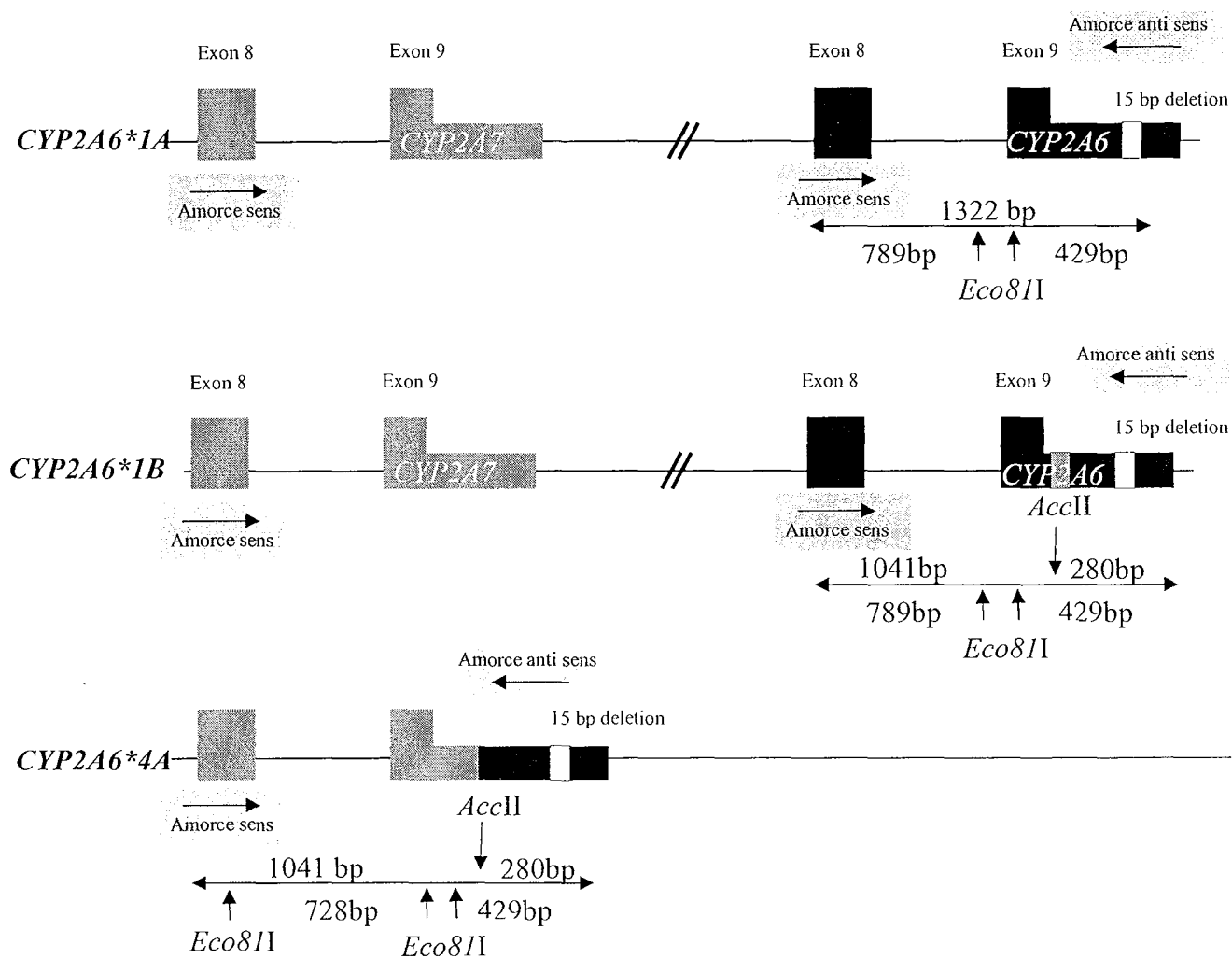


Figure 18: Stratégie d'identification des polymorphismes *CYP2A6*1A*, *CYP2A6*1B*, *CYP2A6*4A* par RFLP (d'après Ariyoshi *et al.*, 2000). Les parties grises correspondent aux exons *CYP2A7* et les noires aux exons *CYP2A6*. *Eco8I* et *AccII* : Enzymes *Eco8I* et *AccII* ; bp : paires de bases ; ↓ site de coupure de l'enzyme.

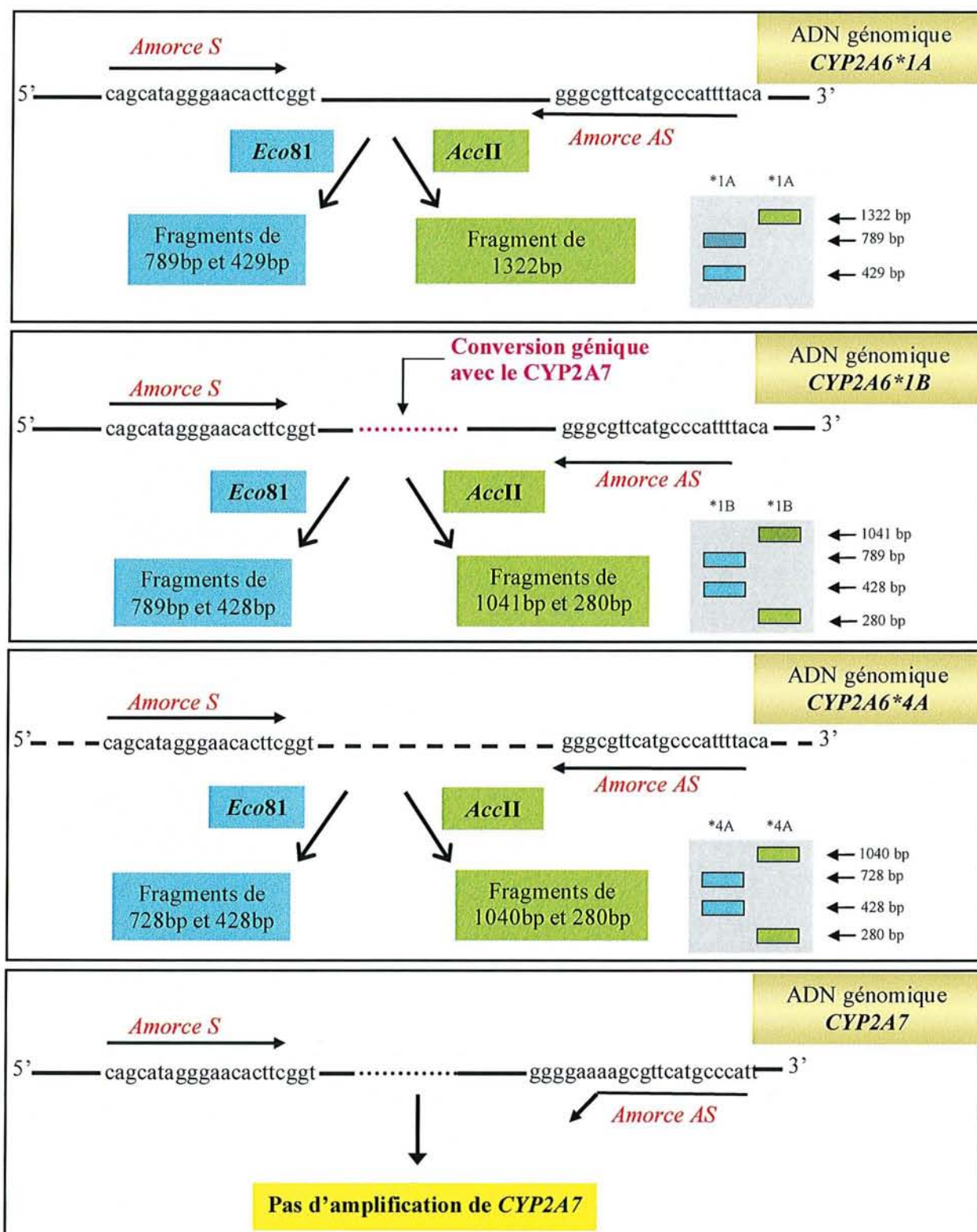


Figure 19 : Principe de la technique de génotypage des *CYP2A6**1A, *CYP2A6**1B, et *CYP2A6**4A. *Eco81* et *AccII* : Enzymes *Eco81* et *AccII* ; S et AS : Amorces sens et anti-sens ; *1A : *CYP2A6**1A ; *1B : *CYP2A6**1B ; *4A : *CYP2A6**4A ; migration des fragments sur gel.

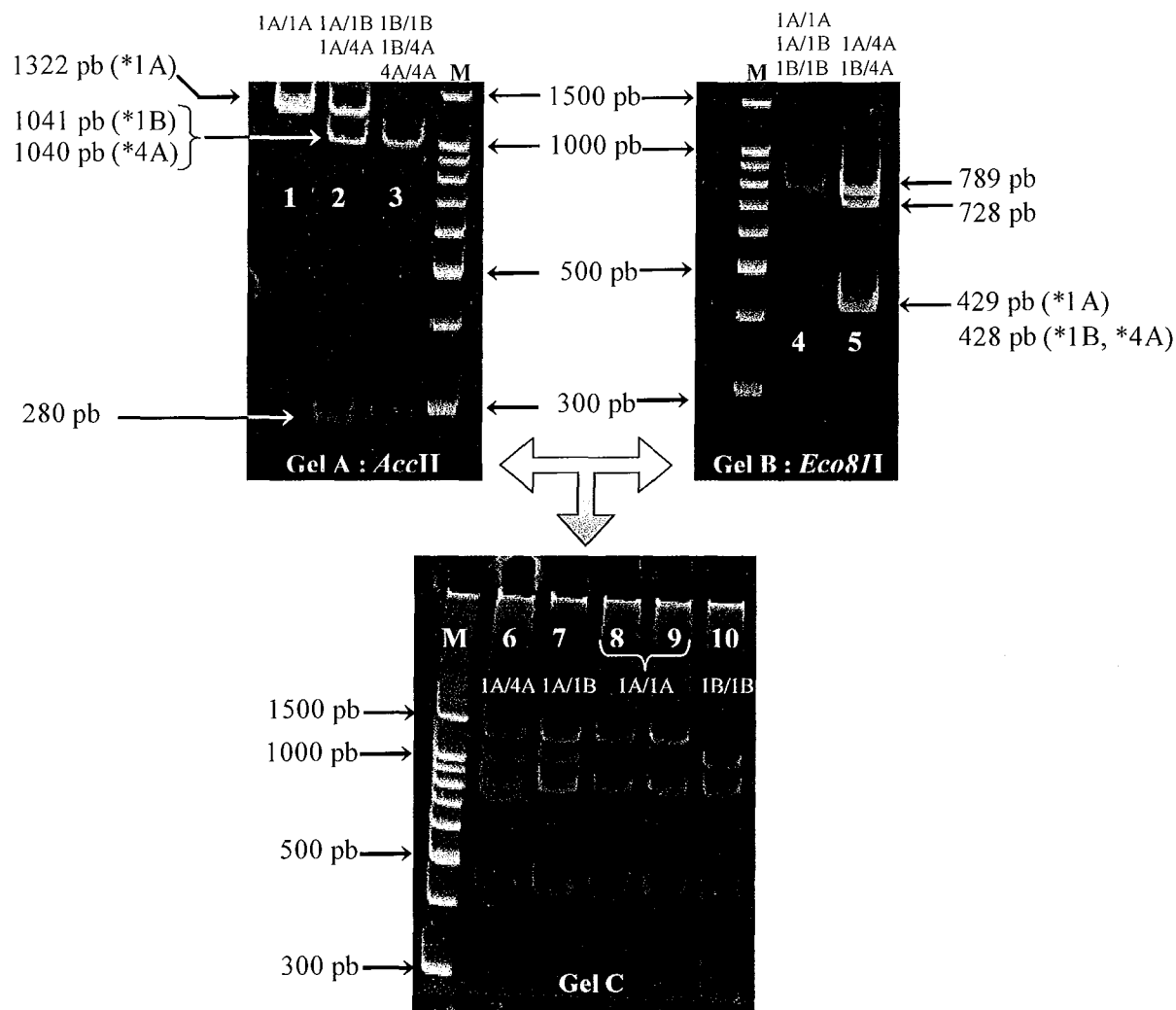


Figure 20 : Gels de migration des produits de PCR digérés des polymorphismes CYP2A6
Les gels A et B correspondent à des dépôts séparés des produits de PCR digérés par l'enzyme *AccII* et *Eco8II* respectivement. Les dépôts correspondent aux polymorphismes :

- (1) CYP2A6*1A/*1A
- (2) CYP2A6*1A/*1B et CYP2A6*1A/*4A
- (3) CYP2A6*1B/*1B, *1B/*4A et *4A/*4A
- (4) CYP2A6*1A/*1A, *1A/*1B et *1B/*1B
- (5) CYP2A6*1A/*4A et *1B/*4A.

Le gel C correspond au dépôt simultané des produits de PCR digérés séparément par les 2 enzymes :

- (6) CYP2A6*1A/*4A
- (7) CYP2A6*1A/*1B
- (8 et 9) CYP2A6*1A/*1A
- (10) CYP2A6*1B/*1B.

M : marqueur de taille.

2.3. GENOTYPAGE DU CYP1A1 ET RECEPTEUR ARH PAR LA METHODE « THERMOCYCLAGE CINETIQUE » OU KTC

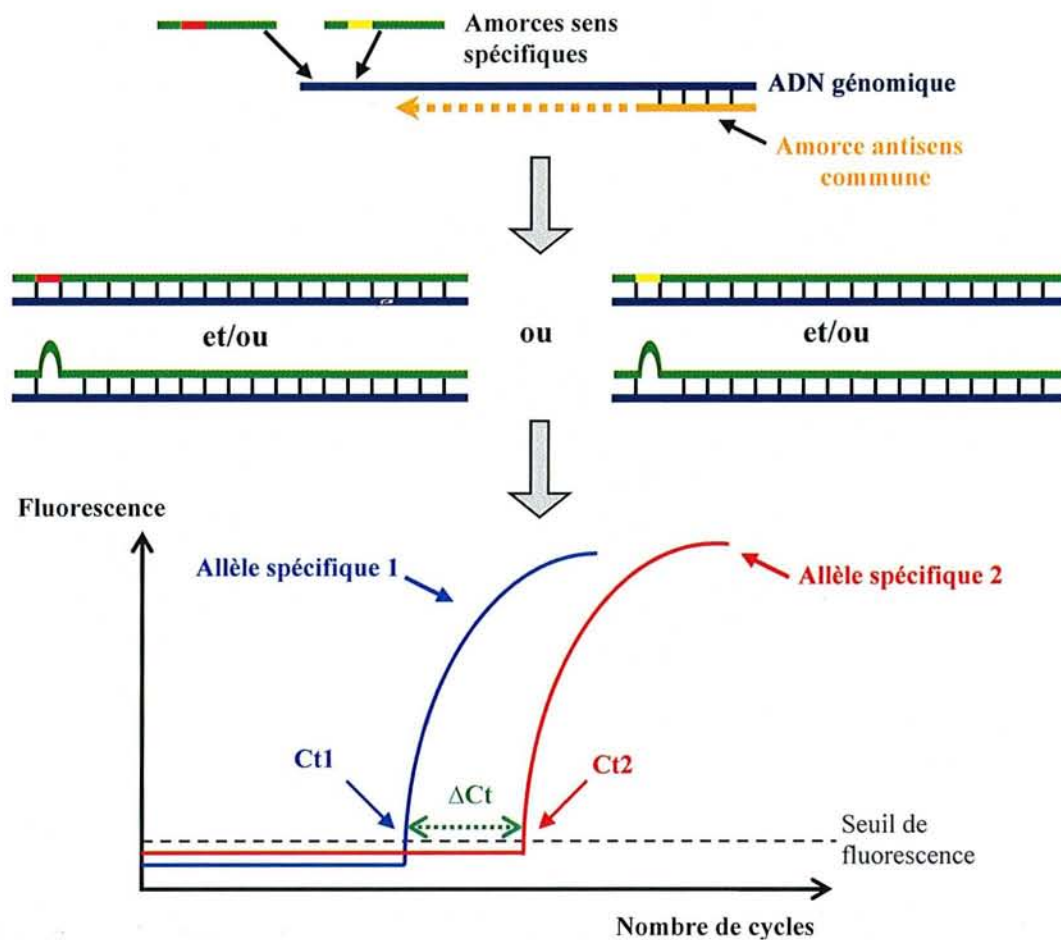
Les génotypages du CYP1A1 et du récepteur AhR sont réalisés en utilisant la technique de PCR par « thermocyclage cinétique » (KTC) en collaboration avec le laboratoire Roche Diagnostics. La technique KTC est basée sur les propriétés de l'ADN polymérase de distinguer les mésappariements entre les primers et les échantillons ADN au niveau de la position 3' du primer (Germer *et al.*, 2000). Pour chaque SNP (Single Nucleotide polymorphism) analysé, des primers sont dessinés : un primer sens pour chaque position spécifique, en l'occurrence la position 3801 du CYP1A1 et 1721 pour le récepteur Ah et un primer commun en position anti-sens. Selon la séquence ADN de l'échantillon, un appariement ou un mésappariement est généré. La réaction est réalisée avec le primer commun et le primer correspondant à la base mutée du gène.

Pour chaque réaction, la formation d'un produit de PCR double brin est fonction de la présence d'un appariement ou d'un mésappariement en position 3' entre le primer et l'ADN. Ceci reflète donc l'association ou non de l'allèle spécifique correspondant à la position du SNP. La formation des doubles brins d'ADN pendant la PCR est détectée par un intercalant fluorescent de l'ADN, le colorant SYBR Green. Les réactions de PCR sont réalisées sur un appareil ABI Prism 7900 (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland) où les intensités de la fluorescence sont enregistrées pendant l'amplification. La fluorescence est fonction du nombre de cycles.

Le nombre de cycles, pour lequel la courbe croise le seuil prédéfini de détection de la fluorescence (limite du bruit de fond), est appelé le Ct de la réaction. Après la réaction de PCR, les produits subissent un processus de dénaturation rapide puis renaturation et enfin dénaturation rapide. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées afin de calculer les courbes de dissociation des produits de PCR qui caractérisent ces derniers. Les produits générés avec la même combinaison de primers sont considérés comme identiques et produisent ainsi des courbes de dissociation identiques.

L'analyse des allèles est réalisée de la manière suivante : dans une première étape, chaque réaction d'amplification est analysée de façon indépendante ; un score positif est attribué si le Ct est inférieur au Ct max défini préalablement avec de l'ADN contrôle de génotypes connus et un score négatif est attribué si le Ct est supérieur au Ct max. A cette étape, toutes les courbes donnant un Ct négatif correspondent à des réactions qui n'ont pas fonctionné. Dans

une deuxième étape, pour chaque échantillon d'ADN, une valeur de ΔCt est déterminée en soustrayant le Ct pour l'allèle 2 du Ct pour l'allèle 1. Tous les échantillons positifs dans la première étape pour un allèle sont considérés comme homozygotes pour cet allèle si leur ΔCt est supérieur à un seuil de ΔCt min déterminé pendant une précédente phase d'optimisation. Tous les échantillons qui ont donné une valeur de Ct positive pour les deux allèles sont considérés comme hétérozygotes si leur ΔCt est inférieur à la valeur absolue de ΔCt max. Tous les échantillons pour lesquels n'a pas pu être déterminé le ΔCt sont considérés comme inexploitable (**Figure 21**).



Analyse :

1^{ère} étape :

$Ct < Ct_{max}$ = positive (analyse acceptée)

$Ct > Ct_{max}$ = negative (analyse refusée)

2^{ème} étape : $\Delta Ct = Ct1 - Ct2$

$\Delta Ct > \Delta Ct_{min}$ = homozygote pour l'allèle 1 ou 2

$\Delta Ct < \Delta Ct_{max}$ = hétérozygote

Figure 21 : Représentation de la technique de « thermocyclage cinétique »

2.4. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS version 8.2 (SAS Institute Inc. Software Etats Unis). Pour vérifier l'influence du sexe sur les différentes variables qualitatives (fumeurs, non-fumeurs et ex-fumeurs, les différents génotypes du gène en question) et quantitatives (âge, IMC, quantité de tabac et alcool, pression artérielle), nous avons effectué :

- un test de χ^2 ou un test exact de Fisher (lorsque les effectifs n'étaient pas suffisants) pour les variables qualitatives
- un test de Student pour toutes les variables quantitatives.

Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$.

- *Polymorphismes du CYP2A6*

Etant donné que la répartition de la variable « nombre de cigarettes fumées par jour » n'a pas pu être définie, un test non paramétrique (test des rangs) a été réalisé, pour chaque sexe séparément, afin de vérifier l'influence des différents polymorphismes (*CYP2A6*1A*, *CYP2A6*1B* et *CYP2A6*4A*) sur la consommation de tabac à T_0 et T_{+5} et sur l'évolution de consommation de tabac entre les deux visites (Δ) en tenant compte de différents paramètres (âge, IMC, consommation d'alcool et pressions artérielles diastoliques et systoliques). Ont été éliminés 2 sujets *CYP2A6*1B/CYP2A6*4A* car cet effectif était insuffisant pour réaliser une étude. Pour les comparaisons multiples, une correction de Bonferroni a été réalisée.

- *Polymorphismes CYP1A1*2 et G1721A AhR*

Une première régression multiple a été utilisée afin de déterminer les effets de chaque polymorphisme sur la pression systolique et diastolique. Une seconde régression multiple a été réalisée afin de vérifier les effets quantitatifs de chaque polymorphisme, c'est-à-dire *CYP1A1* T3801C et *AHR* G1661A chez le fumeur, le non fumeur et l'ex-fumeur. Enfin, un troisième modèle a été employé pour estimer d'une part les effets de l'interaction entre les deux polymorphismes et d'autre part, les interactions entre les polymorphismes et le statut tabagique. Les variables âge, IMC, consommation d'alcool, de cigarettes et de contraceptifs oraux chez la femme ont été incluses dans ces deux modèles. Une correction pour comparaison multiple a été faite en utilisant la méthode du FDR (False Discovery Rate).

Résultats et Discussion

1. Polymorphismes du CYP2A6 et tabac

1.1. Présentation de la population

Nous avons implanté au laboratoire la technique de PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) selon la méthode d'Ariyoshi *et al.*, 2000. Cette technique relativement lourde (une série de 40 sujets génotypés demande environ 8 heures), nous a permis de génotyper 1293 sujets et d'obtenir une répartition des génotypes qui figure sur le tableau VII.

Parmi ces 1293 sujets, nous n'avons retenu pour cette étude que les adultes parents de façon à ne pas introduire ici de biais familial, soit 463 personnes.

1.2. Données générales

Dans un premier temps, les tests statistiques ont été réalisés sur les 463 sujets issus de la population STANISLAS en fonction de leurs différentes caractéristiques et du sexe (**Tableau 3**). A l'aide d'un test de χ^2 , il a été montré que l'échantillon de la population étudiée est en équilibre de Hardy-Weinberg ($p=0,51$).

L'étude de cette population montre qu'il existe une relation entre la quantité cigarettes fumées et le sexe. En effet, les hommes fument plus que les femmes, soit 16,9 ($\pm 10,8$) cigarettes par jour en moyenne contre 11,5 ($\pm 10,8$) chez les femmes ($p<0,001$). Cette relation est aussi observée pour la quantité d'alcool, les hommes consomment plus d'alcool que les femmes, soit 21,5 ($\pm 25,9$) grammes d'alcool par jour en moyenne contre 6,2 ($\pm 11,6$) chez les femmes. Il faut prendre en considération que ces valeurs sont des moyennes et ne suivent pas une distribution gaussienne. Pour extrapoler à la consommation réelle, 21,5 grammes d'alcool par jour correspondent à 25 cl de vin ou 50cl de bière et 6,2 grammes par jour correspondent à 8cl de vin, soit un peu moins d'un verre.

Tableau 3. Caractéristiques démographiques des sujets génotypés CYP2A6 en fonction du sexe.

	Sexe		P
	Hommes	Femmes	
Nombre de sujets	226	237	
Age (années)			
Moyenne	45,5 (4,2)	43,8 (4,3)	NS
Extrêmes [min-max]	[37-58]	[33-56]	
Données			
Indice de masse corporelle	25,8 (3,6)	24,5 (4,4)	<0,01
Taille (cm)	175,3	161,0 (6,0)	NS
Poids (kg)	79,3 (12,4)	63,5 (11,6)	NS
Alcool (g/j)	21,5 (25,9)	6,2 (11,6)	<0,01
Tabac (effectifs)			
Non fumeurs	68 (25,6%)	121 (51,1%)	<0,001
Fumeurs	87(32,7%)	62 (26,2%)	
Anciens fumeurs	71 (26,7%)	54 (22,8%)	
Nombre de cigarettes fumées par jour			
Fumeurs			
Médiane	16,9	11,5	<0,001
Extrêmes [min-max]	[1-50]	[3-50]	
Anciens fumeurs			
Médiane	19,7	16,9	NS
Extrêmes [min-max]	[2-60]	[1-40]	

NS : Différences non significatives. Les valeurs indiquées pour les variables continues sont des valeurs moyennes, entre parenthèse figure l'écart type.

La répartition des polymorphismes *CYP2A6* selon le sexe n'est pas significativement différente (**Tableau 4**). Le génotype majoritaire chez les hommes et les femmes est le CYP2A6*1A/ CYP2A6*1B (43,8% et 42,6% respectivement). 41,2% des hommes et 37,1% sont homozygotes pour l'allèle « sauvage » *CYP2A6*1A*. La fréquence génotypique des homozygotes *CYP2A6*1B* chez les hommes et les femmes est respectivement 6,6% et 13,5%. Aucun des individus génotypés n'est homozygote pour l'allèle *CYP2A6*4A*. Les fréquences alléliques de *CYP2A6*1B*, *CYP2A6*1A* et *CYP2A6*4A* sont respectivement chez les hommes de 28,8%, 67% et 4,2% et chez les femmes de 35,0%, 61,6% et 3,4%.

Tableau 4. Répartition des polymorphismes *CYP2A6* selon le sexe

	Sexe		p
	Hommes	Femmes	
Génotypes CYP2A6			
CYP2A6*1A/CYP2A6*1A	93 (41,2%)	88 (37,1%)	NS
CYP2A6*1A/CYP2A6*1B	99 (43,8%)	101 (42,6%)	
CYP2A6*1B/CYP2A6*1B	15 (6,6%)	32 (13,5%)	
CYP2A6*1A/CYP2A6*4A	18 (8,0%)	15 (6,3%)	
CYP2A6*1B/CYP2A6*4A	1 (0,4%)	1 (0,4%)	
Total	226 (100%)	237 (100%)	
Allèles CYP2A6			
CYP2A6*1A	303 (67,0%)	292 (61,6%)	NS
CYP2A6*1B	130 (28,8%)	166 (35,0%)	
CYP2A6*4A	19 (4,2%)	16 (3,4%)	
Total	452 (100%)	474 (100%)	

NS : Différences non significatives. L'effectif et la fréquence (%) de chaque génotype sont indiqués.

1.3. Polymorphismes *CYP2A6* et tabagisme

Le génotype *CYP2A6* n'est pas significativement associé au statut de fumeur (être un fumeur ou un non fumeur ou cesser plus facilement de fumer) (Tableau 5).

Tableau 5. Effectif et fréquence (%) des polymorphismes *CYP2A6* en fonction du statut tabagique.

<i>CYP2A6</i> génotypes	Fumeurs	Non fumeurs	Anciens fumeurs	Total	p
<i>CYP2A6*1A/ CYP2A6*1A</i>	61 (40.9%)	71 (37.8%)	49 (39.5%)	181 (39.3%)	NS
<i>CYP2A6*1A/ CYP2A6*1B</i>	68 (45.6%)	83 (44.1%)	49 (39.5%)	200 (43.4%)	
<i>CYP2A6*1B/ CYP2A6*1B</i>	13 (8.7%)	18 (9.6%)	16 (12.9%)	47 (10.2%)	
<i>CYP2A6*1A/ CYP2A6*4A</i>	7 (4.7%)	16 (8.5%)	10 (8.1%)	33 (7.1%)	
Total	149 (100%)	188 (100%)	124 (100%)	461 (100%)	

NS : Différences non significatives.

Après avoir réuni les anciens fumeurs et fumeurs dans le même groupe, le nombre de cigarettes fumées par jour une fois ajusté en fonction du sexe s'avère significativement plus élevé chez les sujets porteurs de l'allèle *CYP2A6*1B* homozygotes comparé aux sujets homozygotes « sauvages » (l'allèle *CYP2A6*1A*). Cette différence est significative à la fois à t_0 ($p=0.01$) et t_{+5} ($p=0.001$) (**Tableau 6**). Le nombre de cigarettes fumées par jour augmente dans chaque population durant les cinq années entre t_0 et t_{+5} . Mais l'augmentation la plus importante et la plus significative de cigarettes fumées par jour est dans le groupe des sujets homozygotes pour l'allèle *CYP2A6*1B* comparé aux sujets homozygotes *CYP2A6*1A* ($p=0.006$) (**Tableau 6**).

Tableau 6. Génotypes *CYP2A6* et nombre de cigarettes fumées par jour chez les fumeurs et ex-fumeurs pendant une période de cinq ans.

Génotypes <i>CYP2A6</i>	Cigarettes fumées par jour ^a		Δ cigarettes
	t_0	t_{+5}	
<i>CYP2A6*1A/CYP2A6*1A</i> (n=110) ^c	14.0 $\pm$ 10.0	15.6 $\pm$ 10.2	+1.2 $\pm$ 8.6
<i>CYP2A6*1A/CYP2A6*1B</i> (n=117)	16.3 $\pm$ 10.6	16.3 $\pm$ 10.8	+0.5 $\pm$ 7.9
<i>CYP2A6*1B/CYP2A6*1B</i> (n=29)	17.4 $\pm$ 9.9**	20.9 $\pm$ 11.7***	+3.9 $\pm$ 5.7 **
<i>CYP2A6*1A/CYP2A6*4A</i> (n=17)	11.5 $\pm$ 6.9	15.0 $\pm$ 8.1	+1.2 $\pm$ 5.9

Les valeurs correspondent aux moyennes $\pm$ l'écart type. ^aTest de Rank, le nombre de cigarettes fumées par jour et ajusté sur le sexe est comparé entre chaque génotype *CYP2A6* à chaque examen (t_0 et t_{+5}). Δ cigarettes = nombre de cigarettes fumées par jour à t_{+5} – nombre de cigarettes fumées par jour à t_0 . ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ versus sujets homozygotes allèle fréquent (*CYP2A6*1A*) (c).

1.4. Discussion

Nous avons obtenu des fréquences polymorphiques *CYP2A6*1B* et *CYP2A6*4A* dans la cohorte STANISLAS semblables à celles des autres populations Européennes étudiées (Ariyoshi *et al.*, 2000 ; Oscarson, 2001).

1.4.1. Polymorphismes CYP2A6 et tendance à fumer

Dans notre population, aucune différence significative entre le statut tabagique et le génotype *CYP2A6* n'a été observée. Pianezza *et al.*, 1998, admet que les sujets porteurs de l'allèle muté (*CYP2A6*2* et *CYP2A6*3*) ont moins de risque de devenir dépendant au tabac. Les individus porteurs d'un ou deux allèles *CYP2A6* inactifs (*2, *3 et *4) apparaissent comme des sujets fumant à un âge plus avancé, moins longtemps et sevrés plus rapidement que les sujets porteurs de l'allèle « sauvage » *CYP2A6*1* (Rao *et al.*, 2000 ; Gu *et al.*, 2000). Néanmoins, ces résultats restent conflictuels, en effet, plusieurs auteurs ne montrent aucun lien entre le génotype *CYP2A6* et le statut tabagique (London *et al.*, 1999 ; Lorient *et al.*, 2001).

Plusieurs études ont comparé les sujets porteurs de l'allèle *CYP2A6*1A* versus *CYP2A6*1B* en fonction des habitudes tabagiques. Récemment, Vasconcelos *et al.*, 2005, ont montré une relation entre le génotype *CYP2A6* et la dépendance tabagique dans une population brésilienne. Dans cette même étude, les génotypes possédant au moins un allèle *CYP2A6*1B* étaient surreprésentés chez les non fumeurs comparés aux fumeurs. Ces mêmes auteurs ont aussi montré que posséder un ou deux allèles *CYP2A6*1B* confère à l'individu une probabilité plus faible de devenir dépendant au tabac chez les individus blancs (odds ratio (OR) = 0,07 [0,02-0,20]). En appliquant à notre population française une méthode statistique semblable à celle utilisé par Vasconcelos *et al.*, 2005, l'OR entre fumeurs *versus* non fumeur est égal à 0,90 (0,61-1,32) pour les sujets porteurs d'un ou deux allèles *CYP2A6*1B* comparés aux sujets homozygotes *CYP2A6*1A*. Dans notre étude, les variations génétiques du *CYP2A6* ne sont pas corrélées au sevrage tabagique. L'une des raisons serait que le cytochrome P450 2A6 est principalement concentré dans le foie et détermine la concentration plasmatique de la nicotine, alors qu'une autre enzyme impliquée dans le métabolisme de la nicotine, le CYP2B6, est exprimée dans le cerveau. Lerman *et al.*, 2002, ont démontré que les fumeurs avec une activité CYP2B6 diminuée sont plus vulnérables aux symptômes d'abstinence et présentent plus de difficultés lors du sevrage.

1.4.2. Nombre de cigarettes fumées par jour et polymorphismes

CYP2A6

Notre principal résultat dans notre étude est une association significative entre les fumeurs homozygotes *CYP2A6*1B* et le nombre de cigarettes fumées par jour. Les individus porteurs du génotype *CYP2A6*1B/CYP2A6*1B* fument un nombre significativement plus élevé de cigarettes que les sujets génotypés *CYP2A6*1A/CYP2A6*1A*. Pour minimiser une relation aléatoire, cette observation a été vérifiée à t_0 et t_{+5} et nous avons observé la plus importante augmentation de cigarettes fumées par jour durant cette période de cinq ans chez les sujets homozygotes *CYP2A6*1B* comparés aux autres génotypes.

Malgré deux méta-analyses qui n'ont montré aucune association entre le génotype *CYP2A6* et la quantité de cigarettes fumées (Munafo *et al.*, 2004 ; Carter *et al.*, 2004), plusieurs études confirment que le nombre de cigarettes fumées chez les sujets porteurs d'un ou plusieurs allèles *CYP2A6* défectueux était plus faible comparé aux autres groupes (Schoedel *et al.*, 2004 ; Fujieda *et al.*, 2004 ; Ariyoshi *et al.*, 2002). Fujieda *et al.*, 2004, ont réalisé une étude épidémiologique chez 1705 fumeurs Japonais et ont comparé les individus porteurs d'un ou deux allèles *CYP2A6* défectueux aux sujets génotypés *CYP2A6*1*, incluant les génotypes *CYP2A6*1A* et *CYP2A6*1B*. Dans notre travail, nous avons affiné l'analyse en séparant les sous-groupes *CYP2A6*1A* et *CYP2A6*1B*. L'étude d'Ariyoshi *et al.*, 2002, a montré que les sujets génotypés homozygotes *CYP2A6*1B*, avaient tendance à fumer un plus grand nombre de cigarettes que les sujets génotypés *CYP2A6*1A/CYP2A6*1A*.

CYP2A6 est la principale enzyme responsable du métabolisme hépatique de la nicotine (Messina *et al.*, 1997 ; Nakajima *et al.*, 1996) et les sujets possédant l'allèle *CYP2A6*1B* sont considérés comme des métaboliseurs rapides de la nicotine en cotinine (Schoedel *et al.*, 2004). Ces sujets et plus particulièrement les homozygotes pour l'allèle *CYP2A6*1B*, pourraient être assimilés à des métaboliseurs rapides comparés aux métaboliseurs normaux portant l'allèle *CYP2A6*1A*. En comparant les sujets porteurs de l'allèle *CYP2A6*1X2*, considérés comme métaboliseurs rapides de la nicotine, aux sujets homozygotes *CYP2A6*1* qui regroupent les génotypes *CYP2A6*1A* et *CYP2A6*1B*, l'étude de Tyndale et Sellers, 2002, n'a pas mis en évidence de différence significative du nombre de cigarettes fumées.

Nos résultats suggèrent de reconsidérer avec prudence les sous-groupes du génotype sauvage *CYP2A6*1* dans les études à venir afin de confirmer l'association génotype *CYP2A6*1B* et quantité de tabac. Il est clair que les variations génétiques du *CYP2A6* ne représentent qu'une partie des gènes candidats à l'addiction à la nicotine. Parmi les autres cytochromes P450

impliqués dans l'abus et la dépendance tabagique, le CYP2B6 a un rôle crucial dans le craving des cigarettes (Lerman *et al.*, 2002) alors que le CYP2D6, impliqué à tort dans le métabolisme de la nicotine, ne joue pas un rôle majeur dans les habitudes tabagiques (Caporaso *et al.*, 2001). Plusieurs autres gènes étudiés n'ont montré aucune relation avec le comportement tabagique, comme les gènes *GSTM1*, *GSTT1*, *NAT2*, *GSTP1* et *CYP1A1* (Smits *et al.*, 2004). Néanmoins, le CYP1A1 qui métabolise certains composants du tabac, présente des variations génétiques du CYP1A1 qui contribueraient aux susceptibilités interindividuelles des maladies cardiovasculaires.

1.5. Résumé

Le but de ce travail était d'étudier l'influence du polymorphisme *CYP2A6* sur la quantité de tabac consommée. 463 adultes français de la cohorte STANISLAS ont été sélectionnés lors des deux bilans de santé à cinq ans d'intervalle (t_0 et t_{+5}). Les informations concernant la consommation de tabac ont été recueillies sur questionnaire. Les individus ont été génotypés par RFLP pour les allèles *CYP2A6*1A*, *CYP2A6*1B* et *CYP2A6*4A*.

Les fréquences des allèles *CYP2A6*1B* et *CYP2A6*4A* étaient respectivement de 32 et 4%. Les sujets porteurs de l'allèle *CYP2A6*1B* oxydent plus vite la nicotine en cotinine que les sujets avec l'allèle *CYP2A6*4A*. Le nombre de cigarettes fumées par jour était significativement plus élevé dans le groupe *CYP2A6*1B/CYP2A6*1B* comparé au groupe *CYP2A6*1A/CYP2A6*1A* ($p < 0,01$ à t_0 ; $p < 0,001$ à t_{+5}), avec la plus importante augmentation journalière sur une période de 5 ans ($p < 0,01$). Aucune différence significative n'a été observée entre le statut tabagique et le génotype *CYP2A6*1B*. Ces résultats suggèrent que le *CYP2A6*1B* est associé au nombre de cigarettes fumées par jour.

1.6. Article 1

“Association of CYP2A6*1B genetic variant with the amount of smoking in French adults from the Stanislas cohort.”

Gambier N, Batt AM, Marie B, Pfister M, Siest G, Visvikis-Siest S.

Pharmacogenomics J 2005, 5, 271-5.

Association of *CYP2A6**1*B* genetic variant with the amount of smoking in French adults from the Stanislas cohort

N Gambier¹
A-M Batt¹
B Marie¹
M Pfister¹
G Siest^{1,2}
S Visvikis-Siest^{1,2}

¹Inserm U525, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1, Nancy, France; ²Centre de Médecine Préventive, Avenue du Doyen Parizot, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Correspondence:

Dr S Visvikis-Siest, Inserm U525, Faculté de Pharmacie, 30 Rue Lionnois, Nancy 54000, France.

Tel: +33 3 83 68 21 58

Fax: +33 3 83 32 13 22

E-mail: sophie.visvikis-siest@nancy.inserm.fr

ABSTRACT

This study was designed in order to investigate the influence of the genetic polymorphism of *CYP2A6* on the amount of smoking. In all, 463 French adults included in the Stanislas cohort were studied and underwent two examinations at 5 years distance (t_0 and t_{+5} years). Information on their smoking habits was collected. They were genotyped by RFLP for the *CYP2A6**1*A*, *CYP2A6**1*B* and *CYP2A6**4 alleles. *CYP2A6**1*B* and *CYP2A6**4 allele frequencies were 32 and 4%, respectively. The subjects carrying the *CYP2A6**1*B* allele oxidize nicotine to cotinine faster than subjects with the *CYP2A6**1*A* allele. The number of cigarettes smoked per day was significantly higher in the *CYP2A6**1*B*/**1B* group as compared to the *CYP2A6**1*A*/**1A* group ($P=0.01$ at t_0 ; $P=0.001$ t_{+5} years), with a larger increase in their daily cigarettes consumption over the 5-year period ($P=0.006$). No significant difference in the smoking status was observed according to the *CYP2A6* genotype. These data suggest that the *CYP2A6**1*B* is associated with the number of cigarettes smoked per day.

The Pharmacogenomics Journal (2005) 5, 271–275. doi:10.1038/sj.tpj.6500314; published online 7 June 2005

Keywords: *CYP2A6* genetic; polymorphism; nicotine; smoking; French population

INTRODUCTION

CYP2A6 represents up to 10% of human liver microsomal cytochrome P450 proteins. *CYP2A6* is the major enzyme catalysing the oxidative metabolism of nicotine to cotinine in human liver. Approximately 90% of this pathway is mediated by *CYP2A6*.¹ More than 30 different allelic variants were identified and cause various changes in enzyme activity (see <http://www.imm.ki.se/cypalleles>). There are large ethnic differences in the frequencies of *CYP2A6* alleles that might affect the potency of nicotine metabolism in each population.^{2,3} The 'wild type' of the *CYP2A6* gene is termed *CYP2A6**1*A*. There are three gene deletion alleles, namely *CYP2A6**4*A* (also termed *CYP2A6**4*C*), *CYP2A6**4*B* and *CYP2A6**4*D*.¹ Subjects genotyped as *CYP2A6**4/*CYP2A6**4 are completely deficient in cotinine formation.² The allele frequency of *CYP2A6**4 is low in European and particularly French subjects (4%) compared to Japanese (18%).^{4,5}

A gene conversion of interest is *CYP2A6**1*B* where the 3'-flanking region adjacent to exon 9 has been replaced by the corresponding *CYP2A7* sequence (72 bp).⁶ The subjects who possess the *CYP2A6**1*B* allele appear to show higher capabilities of nicotine metabolism to cotinine.⁷ The allele frequency of

This work was presented as a poster at Santorini Biologie Prospective Conference 2004

Received: 2 November 2004

Revised: 11 February 2005

Accepted: 16 March 2005

Published online 7 June 2005

CYP2A6*1B ranges from 30% in Caucasian subjects⁶ to nearly 40% in Japanese, Korean⁷ and Chinese subjects⁶ and up to 55% in Canadian native Indian.³ Genetic polymorphism in this gene may be of particular importance for an individual's need for nicotine. This study was thus developed to investigate the influence of the genetic polymorphism of CYP2A6 on the amount of smoking in French subjects carrying either the CYP2A6*1B or the CYP2A6*4A allele in comparison to subjects carrying the CYP2A6*1A.

RESULTS

Characteristics of all subjects are summarized in Table 1. In all, 463 subjects, consisting of 226 males and 237 females, were included in the study. The proportion of never smokers was significantly higher among female subjects (51%) than male subjects (30%) in the study population ($P < 0.0001$). The number of cigarettes currently smoked per day was significantly higher in males than in females ($P < 0.0006$), but not in ex-smokers. Each genotype was similarly distributed in males and females. The most frequent genotype in men and women was the heterozygous CYP2A6*1A/CYP2A6*1B pattern (43.8 and 42.6%, respectively). In all, 41.2% of men and 37.1% of women were homozygous for the frequent 'wild-type' CYP2A6*1A allele. The genotype frequency for homozygous CYP2A6*1B in men and women was 6.6 and 13.5%, respectively. None of the tested individuals was homozygous for CYP2A6*4A. The allele frequencies of CYP2A6*1B, CYP2A6*1A and CYP2A6*4A in men were 28.8, 67 and 4.2%, respectively. In women, they were 35.0, 61.6 and 3.4%, respectively. The distribution of polymorphisms was in Hardy-Weinberg equilibrium in the population tested ($P = 0.51$).

The CYP2A6 genotype was not significantly associated with the smoking status (being a smoker or a nonsmoker or being able to quit smoking) (Table 2).

The number of cigarettes smoked per day by both current smokers and ex-smokers taken together was adjusted for gender. It was significantly higher in subjects homozygous for CYP2A6*1B allele compared to homozygous for CYP2A6*1A at t_0 ($P = 0.01$) and at t_{+5} ($P = 0.001$) (Table 3). The number of cigarettes smoked per day increased over the 5-year period between examinations in each group. The increase was significantly larger in the homozygous CYP2A6*1B individuals in comparison to the homozygous CYP2A6*1A ($P = 0.006$) (Table 3).

DISCUSSION

Allele Frequency

The frequency distribution of the CYP2A6*1B and CYP2A6*4A alleles in the present French population was similar to that obtained in other European populations reported by others.^{4,5}

Table 1 Demographic characteristics and CYP2A6 genotypes of subjects according to gender

	Gender		P-value
	Men	Women	
Number of subjects	226	237	
Age (year)			<0.0001
Median	45.5	43.8	
Range	(37–58)	(33–56)	
Smoking status			
Never smokers	68	121	<0.0001
Current smokers	87	62	<0.0001
Ex-smokers	71	54	<0.0001
Number of cigarettes smoked per day			
Current smokers			<0.0006
Median	16.9	11.5	
Range	(1–50)	(3–50)	
Ex-smokers			NS
Median	19.7	16.9	
Range	(2–60)	(1–40)	
CYP2A6 genotypes			
CYP2A6*1A/CYP2A6*1A	93 (41.2%)	88 (37.1%)	
CYP2A6*1A/CYP2A6*1B	99 (43.8%)	101 (42.6%)	
CYP2A6*1B/CYP2A6*1B	15 (6.6%)	32 (13.5%)	
CYP2A6*1A/CYP2A6*4A	18 (8.0%)	15 (6.3%)	NS
CYP2A6*1B/CYP2A6*4A	1 (0.4%)	1 (0.4%)	
Total	226 (100%)	237 (100%)	
CYP2A6 alleles			
CYP2A6*1A	303 (67.0%)	292 (61.6%)	
CYP2A6*1B	130 (28.8%)	166 (35.0%)	
CYP2A6*4A	19 (4.2%)	16 (3.4%)	NS
Total	452 (100%)	474 (100%)	

NS = no significant differences.

Table 2 Smoking status according to CYP2A6 genotypes

CYP2A6 genotypes	Current smoker	Never smoker	Ex-smoker	Total	P-value
CYP2A6*1A/CYP2A6*1A	61 (40.9%)	71 (37.8%)	49 (39.5%)	181 (39.3%)	
CYP2A6*1A/CYP2A6*1B	68 (45.6%)	83 (44.1%)	49 (39.5%)	200 (43.4%)	
CYP2A6*1B/CYP2A6*1B	13 (8.7%)	18 (9.6%)	16 (12.9%)	47 (10.2%)	NS
CYP2A6*1A/CYP2A6*4A	7 (4.7%)	16 (8.5%)	10 (8.1%)	33 (7.1%)	
Total	149 (100%)	188 (100%)	124 (100%)	461 (100%)	

NS = no significant differences.

Table 3 Relationship between CYP2A6 genotypes and number of cigarettes smoked per day by both current smokers and ex-smokers over 5-year follow-up

CYP2A6 genotypes	Cigarettes smoked per day ^a		Δ cigarettes ^b
	t_0	t_{+5}	
CYP2A6*1A/CYP2A6*1A (n = 110)	14.0 ± 10.0	15.6 ± 10.2	+1.2 ± 8.6
CYP2A6*1A/CYP2A6*1B (n = 117)	16.3 ± 10.6	16.3 ± 10.8	+0.5 ± 7.9
CYP2A6*1B/CYP2A6*1B (n = 29)	17.4 ± 9.9*	20.9 ± 11.7**	+3.9 ± 5.7†
CYP2A6*1A/CYP2A6*4A (n = 17)	11.5 ± 6.9	15.0 ± 8.1	+1.2 ± 5.9

Values are mean ± SD.

* $P = 0.01$; ** $P = 0.001$; † $P = 0.006$, vs CYP2A6*1A/CYP2A6*1A (n = 110).^aRank test, number of cigarettes smoked per day compared between CYP2A6 genotypes at each examination (t_0 and t_{+5}) adjusted for gender.^bRank test, Δ cigarettes = cigarettes smoked per day (t_{+5}) – cigarettes smoked per day (t_0).

Tendency to Smoke and CYP2A6 Polymorphism

No significant difference in the smoking status was observed according to the CYP2A6 genotype in our population. Pianezza *et al*⁸ reported that the impairment of the CYP2A6 (CYP2A6*2 and CYP2A6*3) gene function protects a smoker against becoming tobacco dependent. Individuals who have one or two inactive CYP2A6 allele (*2, *3 and *4) have also been reported to start smoking at a later age, to smoke for shorter period of time and to be more likely to quit than the individuals with the 'wild-type' allele (CYP2A6*1).^{9,10} However, these observations remain conflicting. London *et al*,¹¹ observed that subjects with the same reduced-activity alleles were not less likely to smoke. Lorient *et al*,¹² observed no difference in the smoking status according to the CYP2A6 genotype.

Few studies compared the carriers of CYP2A6*1A vs CYP2A6*1B alleles according to the smoking habits. Recently, Vasconcelas *et al*¹³ detected an association between CYP2A6 genotype and smoking dependence in white and intermediate Brazilians. In the same study, genotypes including at least one copy of CYP2A6*1B were over-represented in nonsmokers as compared to smokers. They also observed that carrying one or two CYP2A6*1B allele confers a lower probability for being tobacco dependent with an odds ratio 0.07 (0.02–0.20) in white individuals. We were unable to confirm this observation. By applying a similar statistical method to our white French population, the odds ratio of being smokers vs nonsmokers was 0.90 (0.61–1.32) for genotypes carrying allele CYP2A6*1B as compared to CYP2A6*1A homozygous. In our study, genetic variation in CYP2A6 did not correlate with the ability to quit smoking. One of the reasons might be that CYP2A6 is primarily concentrated in the liver and determine plasma concentration of nicotine, whereas another nicotine metabolism enzyme, CYP2B6, is expressed in the brain.¹⁴ Indeed, Lerman *et al*¹⁴ demonstrated that smokers with a decreased activity variant of CYP2B6 are more vulnerable to abstinence symptoms and craving for cigarettes and exhibit difficulties to quit smoking.

Number of Cigarettes Smoked Per Day

The main finding in our study is a significant association of CYP2A6*1B homozygosity with the number of cigarettes smoked per day. Subjects carrying the CYP2A6*1B/*1B genotype smoked a significantly higher number of cigarettes than the subjects with the CYP2A6*1A/*1A genotype. To minimize a spurious association, this observation was tested at t_0 and t_{+5} and we observed a larger increase in the number of cigarettes smoked per day over the 5-year period in the individuals carrying the CYP2A6*1B/*1B genotype compared to the others.

Two different meta-analysis tested the hypothesis that possessing CYP2A6 reduced-activity polymorphisms made the individuals likely to smoke fewer cigarettes.^{15,16} They both concluded that the overall effect of genotype on smoking frequency indicated no association between the reduced-activity CYP2A6 alleles and the number of cigarettes smoked. Contrastingly, Ariyoshi *et al*¹⁷ reported that the number of daily cigarette consumption in a group with the CYP2A6*4/*4 genotype was significantly smaller when compared with the other genotype groups. More recently, Schoedel *et al*³ concluded that daily cigarette consumption was significantly lower for slow nicotine metabolizers (including CYP2A6*2, CYP2A6*4, CYP2A6*9 and CYP2A6*12 carriers) compared to 'normal' nicotine inactivators (not having any copies of the previously listed alleles) provided that they were nicotine-dependent individuals. Fujieda *et al*¹⁸ performed an epidemiological study in 1705 Japanese smokers. In their study, subjects carrying CYP2A6*4, CYP2A6*7, CYP2A6*9 and CYP2A6*10 alleles smoked significantly less than subjects with the CYP2A6*1/*1 genotype (combining CYP2A6*1A and CYP2A6*1B). These studies compared subjects carrying a deleted gene coding an inactive enzyme to subjects carrying a so-called 'normal' CYP2A6*1 genotype including in the same group subjects with CYP2A6*1A and/or CYP2A6*1B in their genotype. In the present study, we refined the analysis of this group and separated the CYP2A6*1A and CYP2A6*1B subgroups. The study by Ariyoshi *et al*¹⁷ exhibits a tendency of the subjects with the CYP2A6*1B/*1B genotype to smoke a higher

number of cigarettes per day (average number 20–40 cigarettes) than the subjects with the *CYP2A6*1A/*1A* genotype (average number 20–30 cigarettes). These authors do not report having tested the statistical significance of this difference in the number of cigarettes smoked per day, but they found unexpected that their *CYP2A6*1A/*1A* group did not show the highest number of daily cigarette consumption. CYP2A6 is the primary enzyme responsible for liver nicotine metabolism^{19,20} and the subjects who possess the *CYP2A6*1B* allele were reported to show higher capabilities of nicotine conversion to cotinine.³ These subjects particularly when homozygous for *CYP2A6*1B* might be considered as fast metabolizers (FM) compared to extensive metabolizers (EM) carrying the *CYP2A6*1A* allele. Tyndale and Sellers,²¹ having selected a group of FMs on the basis of multiple copies of an active allele (*CYP2A6*1/*1* × 2), reported that these subjects smoked an equal number of cigarettes per day when compared to EMs (homozygous for *CYP2A6*1*, including **1A* and **1B*); however, these FMs smoked each cigarette more intensively and exhibited a high nicotine plasma concentration.

Our data suggest to carefully consider subgroups into the so-called 'wild-type' *CYP2A6*1* genotype in further independent studies to confirm an association of the *CYP2A6*1B* genotype with an amount of smoking, together with a determination of the cotinine to nicotine ratio. In addition, new CYP2A6 variants have been reported harbouring a single-nucleotide polymorphism located in the 5'-flanking region of the *CYP2A6* gene,^{22–23} affecting transcription of previously so-called *CYP2A6*1A* and *CYP2A6*1B*. These finding obviously increases the complexity of the classification of subjects according to the genotype.

Gene Polymorphisms and Tobacco Consumption

It is clear that CYP2A6 genetic variations are only part of the genetic basis of addiction to nicotine. Among CYPs involved in drug abuse and dependence,²⁴ *CYP2B6* gene, as already mentioned, plays a crucial role in craving for cigarettes,¹⁴ whereas *CYP2D6* gene, previously thought to be involved in nicotine metabolism, does not play a major role in smoking practices.²⁵ A large number of candidate genes for smoking behaviour is reviewed in the literature. Various genes that are not associated with smoking behaviour have already been excluded, such as *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *NAT2* and *GSTP1*.²⁶ The possible candidate genes still include genes involved in the dopamine, norepinephrine or serotonin pathways as well as in nicotinic acetylcholine receptors expression.^{27–30} Further progress will thus need larger genomic studies, taking into account new polymorphisms in various candidate genes together with phenotyping and behavioural studies.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and Sampling

Subjects were drawn from the Stanislas cohort, a longitudinal family study recruited between 1994 and 1995 and having a 5-year check up in the Centre de Médecine Préventive in Nancy (France).³¹ Individuals included in this

study had to have French–Caucasian parents and grandparents. Subjects were volunteers for a free health examination and have signed a statement of informed consent. Family members were free from serious and/or chronic diseases (especially cardiovascular, hepatic or renal failure). This study was approved by the Local Ethics Committee of Lorraine (France).

The sample population included 463 adult subjects (226 men and 237 women) who were selected according to their smoking habits and were present at both the first (t_0) and second (t_{+5}) examinations. There were no occasional smokers. Smoking status was categorized into three levels: never smokers, ex-smokers and current smokers. The never smokers were those who had never smoked in their life. The ex-smokers were defined as those who had quit smoking at least 1 year before participation in the study. The current smokers were those who either were currently smoking or had stopped smoking within the previous year. The current smokers were asked to indicate with a structured questionnaire an average of how many cigarettes they smoked per day and ex-smokers an average over the lifetime smoking history.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from venous blood samples by the salting-out method.³² *CYP2A6* gene was analysed for the gene conversion in the 3'-flanking region adjacent to exon 9 (*CYP2A6*1B*) and the deletion type (*CYP2A6*4A*) according to a method reported by Ariyoshi *et al.*⁴ In brief, a region ranging from exon 8 of the *CYP2A7* gene or *CYP2A6* gene to a 3'-untranslated region in exon 9 of the *CYP2A6* gene was amplified, and then digested by the restriction enzymes, *AccII* and *Eco8II*. The *CYP2A6*1A* genotype was defined according to Ariyoshi *et al.*⁴ as 'wild type' but may carry undetected mutations in other regions than the one explored.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SAS software version 8.2. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). In the first step, we used a Student's *t*-test to estimate relationship between gender and parameters and a χ^2 analysis for categorical variables. Finally, we used a rank test to estimate relationship between the genotypes and tobacco consumption at t_0 and t_{+5} .

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr C Sass for her close involvement in the management of the Stanislas cohort. We are also indebted to the staff of the Centre de Médecine Préventive of Vandœuvre-lès-Nancy, France and the participants of the Stanislas cohort, who made this study possible. The Stanislas cohort study is supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (CNAM), the Institut National de Santé et de Recherche Médicale (INSERM), the Région Lorraine, the Communauté Urbaine de Nancy, the Université Henri Poincaré Nancy I, Bayer-Pharma, Hoffmann-LaRoche, Beckman-Coulter, Biomérieux, Daiichi Pure Chemicals, Randox and Dade-Behring.

DUALITY OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

- Rautio A. Polymorphic CYP2A6 and its clinical and toxicological significance. *Pharmacogenom J* 2003; 3: 6–7.
- Nakajima M, Kwon JT, Tanaka N, Zenta T, Yamamoto Y, Yamamoto H et al. Relationship between interindividual differences in nicotine metabolism and CYP2A6 genetic polymorphism in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 72–78.
- Schoedel KA, Hoffmann EB, Rao Y, Sellers EM, Tyndale RF. Ethnic variation in CYP2A6 and association of genetically slow nicotine metabolism and smoking in adult Caucasians. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 615–626.
- Ariyoshi N, Takahashi Y, Miyamoto M, Umetsu Y, Daigo S, Tateishi T et al. Structural characterization of a new variant of the CYP2A6 gene (CYP2A6*1B) apparently diagnosed as heterozygotes of CYP2A6*1A and CYP2A6*4C. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 687–693.
- Oscarson M. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 91–95.
- Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, Agundez JA, Benitez J, Rautio A et al. Identification and characterisation of novel polymorphisms in the CYP2A6 locus: implications for nicotine metabolism. *FEBS Lett* 1999; 460: 321–327.
- Kwon JT, Nakajima M, Chai S, Yom YK, Kim HK, Yamazaki H et al. Nicotine metabolism and CYP2A6 allele frequencies in Koreans. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 317–323.
- Pianezza ML, Sellers EM, Tyndale RF. Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature* 1998; 393: 750.
- Rao Y, Hoffmann E, Zia M, Bodin L, Zeman M, Sellers EM et al. Duplications and defects in the CYP2A6 gene: identification, genotyping, and *in vivo* effects on smoking. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 747–755.
- Gu DF, Hinks LJ, Morton NE, Day IN. The use of long PCR to confirm three common alleles at the CYP2A6 locus and the relationship between genotype and smoking habit. *Ann Hum Genet* 2000; 64: 383–390.
- London SJ, Idle JR, Daly AK, Coetzee GA. Genetic variation of CYP2A6, smoking, and risk of cancer. *Lancet* 1999; 353: 898–899.
- Loriot MA, Rebuissou S, Oscarson M, Cenee S, Miyamoto M, Ariyoshi N et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2A6 in a case-control study on lung cancer in a French population. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 39–44.
- Vasconcelos GM, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. CYP2A6 genetic polymorphisms and correlation with smoking status in Brazilians. *Pharmacogenom J* 2005; 5: 42–48.
- Lerman C, Shields PG, Wileyto EP, Audrain J, Pinto A, Hawk L et al. Pharmacogenetic investigation of smoking cessation treatment. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 627–634.
- Munafò MR, Clark TG, Johnstone EC, Murphy MFG, Walton RT. The genetic basis for smoking behaviour: a systematic review and meta-analysis. *Nicotine Tob Res* 2004; 6: 583–597.
- Carter BL, Long TY, Cinciripini PM. A meta-analytic review of the CYP2A6 genotype and smoking behaviour. *Nicotine Tob Res* 2004; 6: 221–227.
- Ariyoshi N, Miyamoto M, Umetsu Y, Kunitoh H, Dosaka-Akita H, Sawamura Y et al. Genetic polymorphism of CYP2A6 gene and tobacco-induced lung cancer risk in male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 890–894.
- Fujieda M, Yamazaki H, Saito T, Kiyotani K, Gyamfi MA, Sakurai M et al. Evaluation of CYP2A6 genetic polymorphisms as determinants of smoking behavior and tobacco-related lung cancer risk in male Japanese smokers. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2451–2458.
- Messina ES, Tyndale RF, Sellers EM. A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 1608–1614.
- Nakajima M, Yamamoto K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y et al. Role of human cytochrome P450 2A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos* 1996; 24: 1212–1217.
- Tyndale RF, Sellers EM. Genetic variation in CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 163–171.
- Kiyotani K, Fujieda M, Yamazaki H, Shimada T, Guengerich FP, Parkinson A et al. Twenty one novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2A6 gene in Japanese and caucasians. *Drug Metab Pharmacokin* 2002; 17: 482–487.
- Pitarque M, von Richter O, Rodriguez-Antona C, Wang J, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M. A nicotine C-oxidase gene (CYP2A6) polymorphism important for promoter activity. *Hum Mutat* 2004; 23: 258–266.
- Howard LA, Sellers EM, Tyndale RF. The role of pharmacogenetically-variable cytochrome P450 enzymes in drug abuse and dependence. *Pharmacogenomics* 2002; 3: 185–199.
- Caporaso NF, Lerman C, Audrain J, Boyd NR, Main D, Issaq HJ et al. Nicotine metabolism and CYP2D6 phenotype in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 261–263.
- Smits KM, Benhamou S, Garte S, Weijenberg MP, Alamanos Y, Ambrosone C et al. Association of metabolic gene polymorphisms with tobacco consumption in healthy controls. *Int J Cancer* 2004; 110: 266–270.
- Lerman C, Berrettini W. Elucidating the role of genetic factors in smoking behavior and nicotine dependence. *Am J Med Genet* 2003; 118B: 48–54.
- Batra V, Patkar AA, Berrettini WH, Weinstein SP, Leone FT. The genetic determinants of smoking. *Chest* 2003; 123: 1730–1739.
- Wonnacott S, Sidhpura N, Balfour DJ. Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 53–59.
- Tappe AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C et al. Nicotine activation of $\alpha 4^*$ receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science* 2004; 306: 1029–1032.
- Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C et al. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 35–42.
- Miller SA, Dyker DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.

2. Polymorphismes du CYP1A1 et du récepteur AhR et tabac

2.1. Résultats P4501A1 et récepteur AhR

2.1.1. Présentation de la population

Nous avons génotypé par la technique de PCR KTC (Kinetic Thermocycling) 613 sujets. Cette technique nous a permis d'obtenir une répartition des génotypes qui figure sur le tableau 7.

Tableau 7. Caractéristiques démographiques des sujets génotypés CYP1A1 et AhR en fonction du sexe.

	Hommes (n=302)	Femmes (n=311)	p
Age (années)	39,1 (7,4)	36,8 (7,5)	<0,001
Pression artérielle systolique (mmHg)	125,5 (10,4)	117,9 (10,5)	<0,001
Pression artérielle diastolique (mmHg)	75,5 (8,8)	71,1 (8,7)	<0,001
Cholestérol Total (mmol/l)	5,75 (1,04)	5,50 (0,87)	<0,001
Triglycérides (mmol/l)	1,21 (0,73)	0,90 (0,58)	<0,001
Glycémie à jeun (mmol/l)	5,17 (0,48)	4,88 (0,40)	<0,001
Alcool (g/jour)	23,1 (25,5)	7,3 (12,6)	<0,001
Indice de Masse Corporelle (kg/m²)	24,8 (3,2)	23,2 (3,8)	<0,001
Tabac			
Fumeurs (n, %)	131 (43,4%)	86 (27,6%)	
Ex-fumeurs (n, %)	70 (23,2%)	54 (17,4%)	<0,001
Non fumeurs (n, %)	101 (33,4%)	171 (55,0%)	

NS : Différences non significatives. Les valeurs indiquées pour les variables continues sont des valeurs moyennes, entre parenthèses figure l'écart type.

Le tableau 7 présente les caractéristiques démographiques de la population étudiée. Les pressions systoliques et diastoliques étaient plus élevées chez les hommes que les femmes ($p < 0,0001$). Le cholestérol total, les triglycérides, la glycémie, l'IMC et le nombre de fumeurs étaient aussi plus élevés chez les hommes que chez les femmes ($p < 0,001$). Comme pour le

précédent échantillon de la cohorte STANISLAS, les hommes consomment plus d'alcool que les femmes, soit 23,1 ($\pm$ 25,5) grammes d'alcool par jour en moyenne contre 7,3 ($\pm$ 12,6) chez les femmes.

Les fréquences alléliques du polymorphisme T3801C du gène CYP1A1 étaient respectivement de 11,1% et 7,6% chez les hommes et les femmes et celles de l'allèle rare AhR R554K étaient respectivement de 13,1% et 10,6% chez les hommes et les femmes (**Tableau 8**). L'échantillon de la population étudiée était en équilibre de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,11$; $p=0,74$ et $\chi^2=1,09$; $p=0,30$ respectivement pour CYP1A1 et AhR).

Tableau 8. Répartition des polymorphismes *CYP1A1* et *AhR* selon le sexe.

	Hommes (n=302)	Femmes (n=311)	p
Génotype CYP1A1 T3801C			
TT (n, %)	240 (79,5%)	265 (85,2%)	NS
TC (n, %)	57 (18,8%)	45 (14,5%)	
CC (n, %)	5 (1,7%)	1 (0,3%)	
Génotype AhR G1661A			
GG (n, %)	230 (76,2%)	251 (80,7%)	NS
GA (n, %)	65 (21,5%)	56 (18,0%)	
AA (n, %)	7 (2,3%)	4 (1,3%)	
Fréquence allélique allèle rare			
CYP1A1 3801C (%)	11,1%	7,6%	NS
AHR 1661A (%)	13,1%	10,6%	NS

NS : Différences non significatives. L'effectif et la fréquence (%) de chaque génotype sont indiqués.

2.1.2. Pression artérielle en fonction du statut tabagique

Les pressions artérielles systoliques et diastoliques en fonction du statut tabagique, après ajustement sur l'âge, l'IMC (Indice de masse corporelle), la consommation d'alcool en g par jour et la prise d'un contraceptif oral chez la femme, sont présentées dans le **tableau 9**.

Tableau 9. Analyse par régression multiple de la pression artérielle systolique et diastolique en fonction du statut tabagique.

		Non fumeurs	Fumeurs	Anciens fumeurs	p
Pression artérielle systolique	Hommes	126,6 (1,7)	124,9 (1,5)	130,1 (1,9)	NS
	Femmes	119,4 (1,3)	117,5 (2,0)	114,0 (2,3)	NS
Pression artérielle diastolique	Hommes	76,5 (1,5)	73,5 (1,3)	78,9 (1,6)	<0,05
	Femmes	72,1 (1,0)	70,3 (1,6)	68,2 (1,8)	NS

Les valeurs indiquées sont des valeurs moyennes, entre parenthèses figure l'écart type. Les pressions artérielles systoliques et diastoliques mesurées en mm de Hg, sont ajustées en fonction de l'âge, de l'IMC (Indice de masse corporelle), la consommation d'alcool en gramme par jour et la contraception orale pour les femmes.

NS : Différences non significatives.

Aucune différence significative entre la pression artérielle et le statut tabagique n'a été observée, à l'exception de la pression artérielle diastolique chez les hommes fumeurs qui semble plus basse.

2.1.3. Pression artérielle en fonction des polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* G1661A

Après ajustement sur l'âge, l'IMC, la consommation d'alcool et la contraception orale chez la femme, les pressions artérielles ont été comparées en fonction des polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* G1661A. Les résultats sont présentés dans le **tableau 10**.

Tableau 10. Pression artérielle en fonction des polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* G1661A.

	Hommes			Femmes		
	n=302			n=311		
CYP1A1 T3801C	TT (n=240)	TC+CC (n=62)	p	TT (n=265)	TC+CC (n=46)	p
PAS (mmHg)	126,3 (1,1)	130,0 (1,9)	0,09	116,6 (1,2)	120,0 (2,8)	NS
PAD (mmHg)	75,5 (0,9)	78,5 (0,9)	0,09	70,2 (1,0)	70,3 (2,2)	NS
AhR G1661A	GG (n=230)	GA+AA (n=72)	p	GG (n=251)	GA+AA (n=60)	p
PAS (mmHg)	127,8 (1,1)	125,2 (2,0)	NS	116,8 (1,3)	117,7 (2,4)	NS
PAD (mmHg)	77,0 (0,9)	74,1 (1,7)	NS	70,0 (1,0)	70,8 (1,9)	NS

NS : Différences non significatives. Les valeurs indiquées sont des valeurs moyennes, entre parenthèses figure l'écart type. Les pressions artérielles systoliques (PAS) et diastoliques (PAD) mesurées en mm de Hg, sont ajustées en fonction de l'âge, de l'indice de masse corporelle, la consommation d'alcool en gramme par jour et le tabac. TC+CC correspond à la présence de l'allèle le moins fréquent pour le polymorphisme du gène *CYP1A1* et GA+AA pour le polymorphisme du gène *AhR*.

Les sujets hommes porteurs de l'allèle muté du gène *CYP1A1* (hétérozygotes ou homozygotes) tendent à présenter une tension artérielle systolique et diastolique plus élevée que les hommes homozygotes pour l'allèle fréquent du gène *CYP1A1* (génotype TT) ($p=0,09$). Contrairement aux hommes, les pressions artérielles systoliques et diastoliques des femmes ne semblent pas être influencées par le génotype du gène *CYP1A1*. Similairement, le génotype du gène *AhR* n'influence pas les pressions artérielles systoliques et diastoliques ni chez l'homme ni chez la femme.

2.1.4. Pression artérielle en fonction du statut tabagique et du polymorphisme *CYP1A1* T3801C.

Les pressions artérielles ont été comparées en fonction du statut tabagique et du polymorphisme *CYP1A1* T3801C après ajustement sur l'âge, l'indice de masse corporelle, la consommation d'alcool en g par jour et la contraception orale chez la femme (**figure 22**).

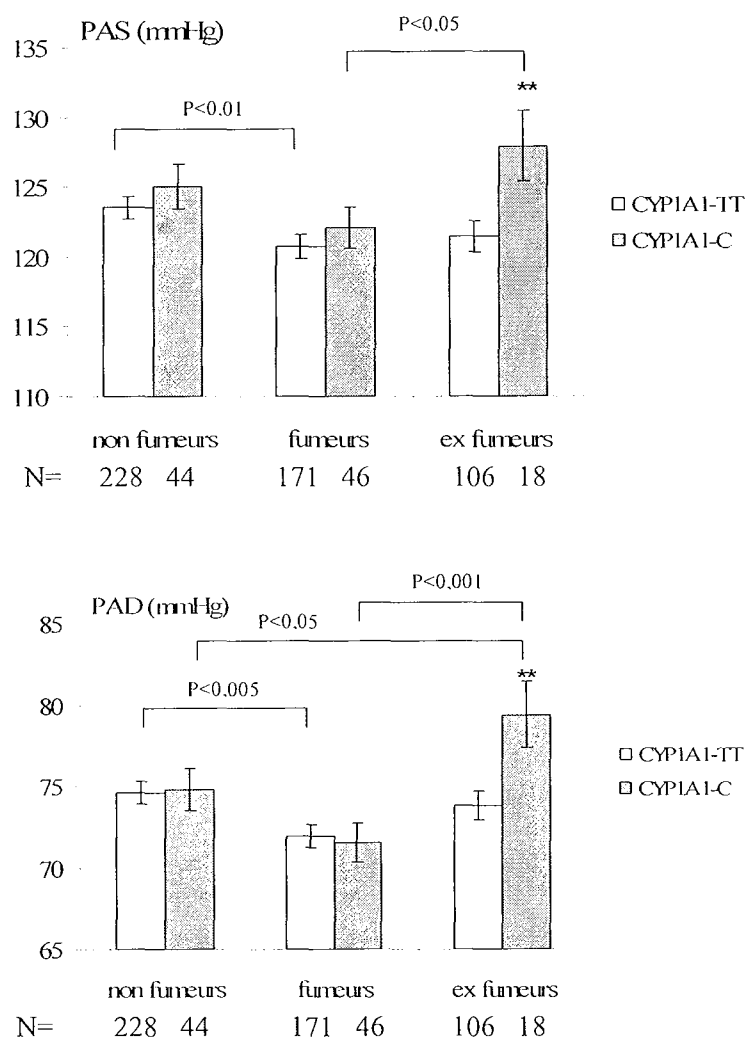


Figure 22. Pressions artérielles systoliques et diastoliques en fonction du statut tabagique et du polymorphisme *CYP1A1* T3801C.

Les pressions artérielles systoliques (PAS) et diastoliques (PAD) mesurées en mm de Hg, sont ajustées en fonction de l'âge, de l'indice de masse corporelle, la consommation d'alcool en gramme par jour et la contraception orale chez la femme. Les sujets homozygotes pour l'allèle fréquent du gène *CYP1A1* correspondent aux rectangles blancs et les sujets porteurs au moins d'un allèle muté du gène *CYP1A1* sont représentés par la couleur grise. N correspond au nombre de sujets. ** $p < 0.01$.

En fonction du génotype *CYP1A1* chez les anciens fumeurs, les pressions artérielles varient. Les anciens fumeurs porteurs de l'allèle muté du gène *CYP1A1* ont une tension artérielle systolique et diastolique plus élevée que les anciens fumeurs porteurs de l'allèle fréquent *CYP1A1* ($p < 0,01$) d'une part et que les fumeurs porteurs de l'allèle muté d'autre part ($p < 0,05$ non confirmé après correction pour la PAS et $p < 0,001$ pour la PAD). Parmi les sujets homozygotes pour l'allèle fréquent *CYP1A1*, les pressions artérielles systoliques et diastoliques sont significativement plus élevées dans le groupe des non fumeurs que dans le groupe des fumeurs ($p < 0,01$ et $p < 0,005$ respectivement).

2.1.5. Pression artérielle chez l'ancien fumeur en fonction du délai depuis l'arrêt du tabac et le polymorphisme *CYP1A1* T3801C.

Après ajustement sur l'âge, l'IMC, la consommation d'alcool en g/j et la prise d'un contraceptif oral chez la femme, les pressions artérielles ont été comparées en fonction du statut tabagique et plus particulièrement chez l'ancien fumeur. Le groupe ex fumeurs a été stratifié en deux sous groupes, les ex fumeurs ayant cessé de fumer depuis moins de cinq ans et ceux depuis plus de cinq ans (**figure 23**).

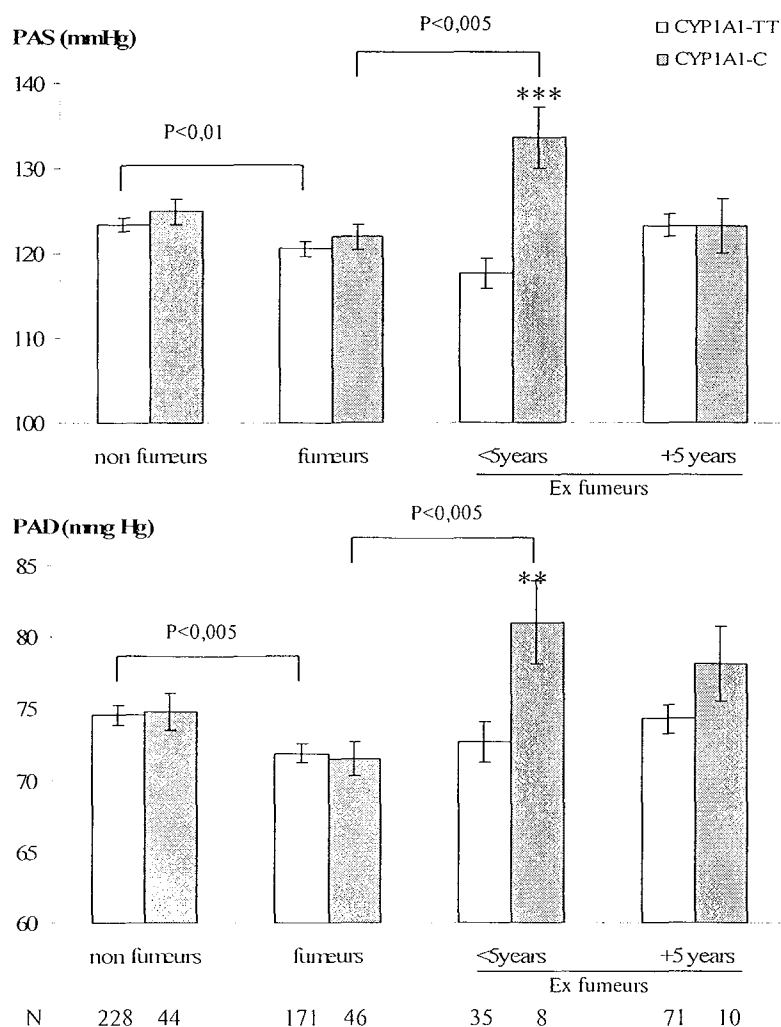


Figure 23. Pression artérielle systoliques et diastoliques chez l'ancien fumeur et en fonction du polymorphisme *CYP1A1* T3801C.

Les pressions artérielles systoliques (PAS) et diastoliques (PAD) mesurées en mm de Hg, sont ajustées en fonction de l'âge, de l'indice de masse corporelle, la consommation d'alcool en g/j et la contraception orale chez la femme. Les valeurs indiquées sont les valeurs moyennes plus ou moins l'écart type. *CYP1A1* TT (sujets homozygotes pour l'allèle fréquent *CYP1A1*) vs *CYP1A1* C (sujets porteurs d'un ou deux allèles mutés du gène *CYP1A1*) (**p<0,005, *** p<0,001).

L'augmentation significative de la pression artérielle systolique et diastolique est observée chez un nombre faible de sujets porteurs de l'allèle muté du gène *CYP1A1* T3801C et ayant cessé de fumer depuis moins de cinq ans (p<0,005, p<0,001 respectivement). Les pressions artérielles systoliques et diastoliques sont aussi significativement plus élevées chez les sujets porteurs de l'allèle muté du gène *CYP1A1* ayant récemment cessé de fumer (moins de cinq ans) que chez les fumeurs (p<0,005 et p<0,005 respectivement).

2.1.6. Pression artérielle en fonction du statut tabagique et des polymorphismes *CYP1A1* T3801C *AhR* G1661A.

L'influence des polymorphismes *CYP1A1* T3801C *AhR* G1661A sur la pression artérielle a été mesurée en fonction du statut tabagique (figure 24).

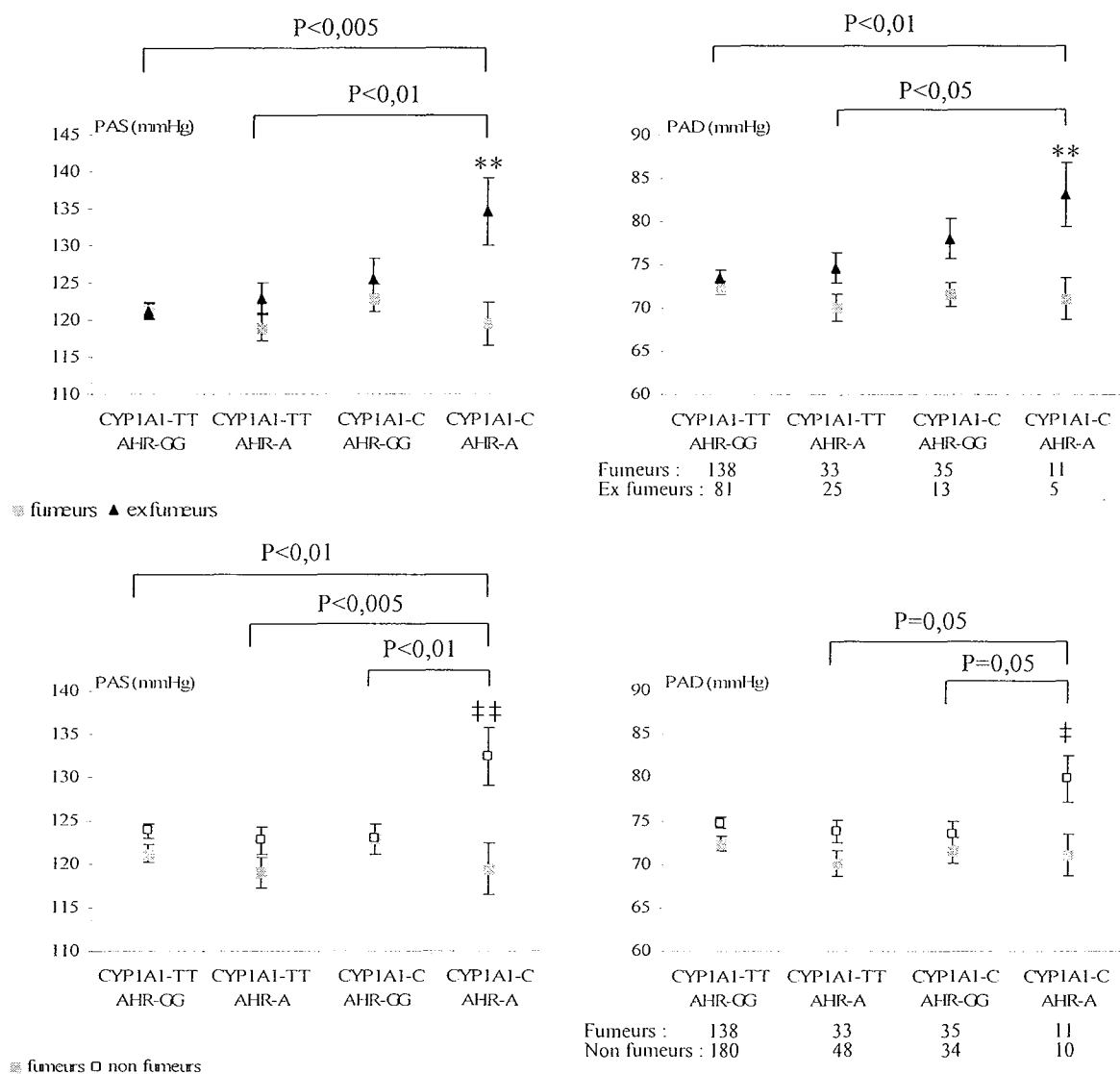


Figure 24. Pressions artérielles systoliques et diastoliques en fonction du statut tabagique et des polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* G1661A.

Les pressions artérielles systoliques (PAS) et diastoliques (PAD) mesurées en mm de Hg, sont ajustées en fonction de l'âge, de l'indice de masse corporelle, la consommation d'alcool en g/j et de la contraception orale chez la femme. Les valeurs indiquées sont les valeurs moyennes plus ou moins l'écart type. Ex fumeurs vs fumeurs (**p<0,01)

Non fumeurs vs fumeurs (†p<0,05, †† p<0,005).

Les ex fumeurs et non fumeurs porteurs à la fois des allèles mutés des gènes *CYP1A1* T3801C et *AhR* G1661A ont la tension artérielle la plus élevée.

2.2. Discussion P4501A1 et récepteur AhR

Dans cette seconde partie du travail, nous avons étudié l'influence des polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* A554K sur la pression artérielle dans une population française saine. La répartition des génotypes et la fréquence des allèles rares étaient semblables à celles observées dans la population Caucasienne (Wang *et al.*, 2002). Notre hypothèse posée était qu'une modification de l'activité du *CYP1A1* due aux polymorphismes *AhR* et *CYP1A1* conduirait à des changements significatifs dans l'homéostasie vasculaire et plus particulièrement dans la pression artérielle.

Nos résultats mettent en évidence que les pressions artérielles systoliques (PAS) et diastoliques (PAD) chez l'homme et la femme tendent à être plus basses chez le fumeur que chez le non fumeur. Même si cela peut paraître paradoxal, probablement due à des facteurs de confusion, plusieurs études confirment ces résultats (Okubo *et al.*, 2004). Les effets du tabagisme sur la pression artérielle semblent complexes et sont peu étudiés. L'une des hypothèses retenue est que l'activité du *CYP1A1* induite chez le fumeur par le tabac est particulièrement importante (Zevin et Benowitz, 1999). Cette enzyme *CYP1A1* métabolise l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) en composés vasodilatateurs (Schwarz *et al.*, 2004).

Une autre hypothèse qui n'implique pas l'enzyme *CYP1A1* serait une activation de la Rho-kinase par le tabac dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux, même si les conséquences sur la pression artérielle semblent incertaines (Noma *et al.*, 2003).

Une augmentation de la PAS et de la PAD a été observée chez les anciens fumeurs possédant l'allèle rare *CYP1A1* comparés aux sujets porteurs de l'allèle fréquent. Plusieurs études épidémiologiques ont décrit une augmentation de la pression artérielle après sevrage tabagique chez les hommes (Okubo *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2001).

2.2.1. Pression artérielle en fonction du polymorphisme *CYP1A1*.

De ce travail, il ressort que les individus porteurs de l'allèle muté du gène *CYP1A1* auraient un risque plus élevé d'hypertension artérielle après arrêt du tabac et plus particulièrement quand ils ont cessé récemment de fumer. Il est très probable que le polymorphisme *CYP1A1*2A* soit associé à une forte induction du gène en réponse à l'exposition tabagique (Georgiadis *et al.*, 2005). Chez les individus, l'augmentation de l'activité « aryl hydrocarbon

hydroxylase » est corrélée au polymorphisme *MspI* et plus particulièrement chez les sujets homozygotes pour l'allèle le moins fréquent qui présentent une plus forte induction que les sujets génotypés homozygotes pour l'allèle fréquent (Kiyohara *et al.*, 1996).

Plusieurs travaux montrent une augmentation du risque cardiovasculaire associé à l'allèle muté du gène *CYP1A1* et ou au statut tabagique. Le risque d'infarctus chez les hypertendus et de pathologie tritonculaire, particulièrement chez les « petits » fumeurs est plus important chez les sujets porteurs de l'allèle muté du gène *CYP1A1* (Lança *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2003a ; Wang *et al.*, 2002).

2.2.2. Influence du polymorphisme AhR sur la tension artérielle

Le génotype *AhR* apparaît comme n'ayant aucune relation avec la pression artérielle dans notre population étudiée. Cependant, quand les valeurs des pressions artérielles systoliques et diastoliques sont ajustées en fonction de l'âge, du sexe, de l'IMC, de la consommation d'alcool et de la contraception orale chez la femme, les ex fumeurs et non fumeurs porteurs à la fois des allèles mutés des gènes *CYP1A1* et *AhR* ont les valeurs PAS et PAD les plus élevées. Le récepteur AhR contribue certainement à la régulation de la pression artérielle comme cela a été démontré chez la souris déficiente du récepteur AhR qui développe une hypertension artérielle dès l'âge de 2 mois (Lund *et al.*, 2003). Ces souris KO *AhR* développent aussi une hypertrophie cardiaque associée à une augmentation de synthèse du facteur de croissance VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Thackaberry *et al.*, 2002). Le gène *AhR* est activé transcriptionnellement par les constituants de la fumée de cigarette (Meek and Finch, 1999). Cependant, les effets génotypiques du récepteur AhR muté ne sont toujours pas expliqués (Harper *et al.*, 2002). Même si le nombre de sujets était faible, notre étude indique que les sujets possédant les allèles mutés des gènes *CYP1A1* et *AhR* présentent les PAS et PAD les plus élevées lorsqu'ils cessent de fumer. Ces résultats tendent à dire que le gène *AhR* contribue à la régulation de la pression artérielle via une interaction entre le polymorphisme R554K et le polymorphisme *CYP1A1* T3801C. En fait, l'équipe de Karyala *et al.*, 2004, a observé que les cellules musculaires lisses de souris déficientes du récepteur AhR répondaient différemment aux inducteurs par rapport aux cellules de souris non déficientes. Brièvement, ils ont observé des réponses différentes de 107 gènes aux inducteurs entre les cellules AhR^{-/-} et non déficientes, incluant les gènes TGF- β (transforming growth factor- β) et l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1). Ces deux gènes participent à la régulation de la pression artérielle (Kuo *et al.*, 2005 ; Dahly-Vernon *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent que

les sujets génotypés *CYP1A1* T3801C et *AhR* R554K devraient faire l'objet d'une surveillance médicale plus accrue dans le cadre de la prévention de l'hypertension artérielle.

2.2.3. Cytochromes P450 comme gènes candidats dans la régulation de la pression artérielle

A l'heure actuelle, trois cytochromes P450, CYP2C9, CYP3A5 et CYP4A11 sont connus pour être des gènes candidats à l'hypertension artérielle en fonction du genre et de l'ethnie. L'allèle *CYP3A5*1* est plus fréquent chez les Afro-Américains hypertendus alors que cet allèle n'influence pas la régulation de la pression artérielle chez les Blancs (Ho *et al.*, 2005 ; Givens *et al.*, 2003). Une diminution de fonctionnalité du variant *CYP4A11* (allèle 8590C) est associée à l'hypertension chez les Blancs (Gainer *et al.*, 2005). Finalement, nous suggérons que les polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* R554K soient considérés comme de nouveaux marqueurs dans la régulation de la pression artérielle.

2.3. Résumé

Le cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), principale voie de détoxification des composés produits lors de la combustion de cigarette, est régulé par le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR). Le polymorphisme *CYP1A1* T3801C, corrélé à une augmentation de l'activité enzymatique et à une inductibilité plus importante, contribuerait aux maladies cardiovasculaires comme les accidents vasculaires cérébraux et les coronaropathies, et serait probablement associé à la pression artérielle. Les éventuelles interactions avec le polymorphisme A554K du gène humain *AhR* et la pression artérielle semblent méconnues.

Notre objectif dans ce travail est d'investiguer l'influence des polymorphismes génétiques *CYP1A1* T3801C et *AhR* R554K sur la pression artérielle en fonction du statut tabagique.

302 hommes et 311 femmes ont été sélectionnés à partir d'une cohorte longitudinale française lors d'un bilan de santé complet. Ces individus supposés sains ne prenaient aucun médicament qui puisse affecter la pression artérielle. Les informations concernant la consommation de tabac ont été recueillies sur questionnaire.

Après analyse par régression multiple, la pression artérielle systolique (PAS) et diastolique (PAD) ne varie pas significativement en fonction du statut tabagique, excepté la PAD chez les hommes. De plus, aucun des polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* R554K n'est lié à la tension artérielle. Néanmoins, les PAD et PAS diffèrent significativement en fonction du polymorphisme *CYP1A1* T3801C entre les anciens fumeurs et fumeurs. Finalement, l'interaction entre les polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* R554K révèle une différence significative des PAS et PAD chez les sujets porteurs à la fois des allèles *CYP1A1* T3801C et *AhR* R554K.

Notre travail montre pour la première fois que l'interaction entre les polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* R554K est associée à une augmentation de la pression artérielle chez les non fumeurs et ex fumeurs. Ces résultats confirment l'importance d'étudier les interactions entre les polymorphismes génétiques et les facteurs environnementaux.

2.4. Article 2

“Interaction between CYP1A1 T3801C and AhR R554K polymorphisms according to smoking status on blood pressure in Stanislas cohort”

Nicolas Gambier, Jean-Brice Marteau, Anne-Marie Batt, Bérangère Marie, Annick Thompson, Gérard Siest, Dorothee Foernzler and Sophie Visvikis-Siest

Soumis à Journal of Hypertension

**INTERACTION BETWEEN CYP1A1 T3801C AND AHR R554K
POLYMORPHISMS ACCORDING TO SMOKING STATUS ON BLOOD
PRESSURE IN STANISLAS COHORT**

Nicolas GAMBIER^(a), Jean-Brice MARTEAU^(a), Anne-Marie BATT^(a), Bérangère
MARIE^(a), Annick THOMPSON^(b), Gérard SIEST^(a), Dorothee FOERNZLER^(b) and
Sophie VISVIKIS-SIEST^(a)

(a) INSERM U525, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy 1, 30 Rue
Lionnois, 54000 Nancy, France.

(b) Roche Center for Medical Genomics, F.Hoffmann-La Roche, Ltd PRG, Bau
93/4.26, CH-4070 Basel, Switzerland.

Short title: *CYP1A1* T3801C and *AHR* R554K polymorphisms on blood pressure

Correspondence to:

Dr Sophie VISVIKIS-SIEST
INSERM U525 Equipe 4
Faculté de Pharmacie
30, Rue Lionnois
54000 Nancy - FRANCE
Phone: +33.3.83 68 21 58
Fax: +33.3.83 32 13 22
e-mail : Sophie.Visvikis-Siest@nancy.inserm.fr

Wordcount of text: 3449

Total number of figures: 2

Total number of tables: 3

Abstract

Background

CYP1A1, one of the key enzymes in detoxifying toxic components produced during cigarette smoking, is regulated by aromatic hydrocarbon receptor (AHR). A *CYP1A1* T3801C polymorphism, associated with a higher CYP1A1 inducibility and enhanced catalytic activity has been linked to stroke, triple vessel disease and may, therefore, be associated with blood pressure (BP). The relation of the widely studied A554K polymorphism of the human *AHR* gene with BP is unknown.

Objectives

To investigate genetic influence of *CYP1A1* T3801C and *AHR* R554K polymorphisms on BP in relation to tobacco consumption.

Design and participants

302 men and 311 women have been selected from a French longitudinal cohort of volunteers for a free health check-up. These individuals were not taking medication that can affect blood pressure. Information about active smoking status has been obtained by a self-administered questionnaire.

Results

After multiple regression analysis, SBP and DBP did not differ significantly according to their tobacco status excepted for DBP in men. In addition, neither CYP1A1 T3801C nor AHR G1661A polymorphism was linked to blood pressure. However, systolic and diastolic blood pressures differ significantly according to CYP1A1 T3801C genotype between ex-smokers and smokers. Finally, the interaction between CYP1A1 and AHR R554K polymorphisms explained a significant difference of SBP and DBP between carriers of both CYP1A1-C3801 and AHR-A1661 alleles.

Conclusion

This study is the first to show an interaction between the *CYP1A1* T3801C and AHR G1661A polymorphisms. This interaction could explain the difference in blood pressure level between smokers and non-smokers/ex-smokers but need to be confirmed in a large sample.

Word count of abstract: 250

Keywords: CYP1A1, AHR, genetic polymorphisms, smoking, blood pressure

Introduction

CYP1A is a member of a large class of cytochrome P450 enzymes (CYP) [1]. Human CYP1A1 is expressed extra-hepatically, and contributes to the detoxification of a variety of xenobiotics, such as the conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) or aromatic amines that are constituents of tobacco smoke [2,3]. Induction of a CYP1A1 by various environmental products, including cigarette smoke [4], is regulated by aromatic hydrocarbon receptor (AHR). Polymorphisms in the *AHR* gene as well as polymorphisms located in catalytic or regulatory domains of the *CYP1A1* gene could be expected to have important consequences on the function of the CYP1A1-NADPH reductase enzyme system. Consequently, this could lead to changes in sensitivity to exposure to cigarette smoke.

Among the *CYP1A1* polymorphisms, a cytosine instead of thymine at the 3'-flanking region of the *CYP1A1* gene (T3801C) gives rise to an *MspI* restriction site [5]. This allele is termed *CYP1A1**2 and is found with a frequency of 10% in European populations [6]. Furthermore, *CYP1A1**2 allele confers the highest susceptibility to develop cigarette-induced lung cancer and cardiovascular diseases [7] by increasing CYP1A1 inducibility and catalytic activity [8,9].

The G1661A is the major polymorphism found in the *AHR* gene. The substitution of a guanine by an adenine results by replacing Lys (AAA) instead of Arg (AGA) at the codon 554 [10]. The 1661A allele frequency is quite similar between Japanese (43%) [11] and African-American (41%) [12] populations but is much lower in the Caucasian populations (9-12%) [10, 12]. No association was found between the codon 554 polymorphism and the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) or 3 methylcholanthrene (3MC)-induced CYP1A1 activity, chloracne, lung cancer, bladder

cancer, micropenis, or endometriose [13]. However, caucasians with at least one copy of the G1661A *AHR* variant allele showed a significantly higher level of ethoxyresorufin O-deethylase (EROD)-induced CYP1A1 activity compared with individuals negative for the polymorphism [12].

The *CYP1A1* T3801C polymorphism, associated with a higher CYP1A1 inducibility and enhanced catalytic activity, has been linked to stroke, triple vessel disease and may, therefore, be associated with blood pressure. In addition, genetic deletion of *AHR* can lead to cardiac hypertrophy and elevated arterial blood pressure by 5 months in mice [14]. Based on the existent relationship between the *CYP1A1* T3801C and/or the *AHR* R554K polymorphisms and the cigarette smoking related to risk of cardiovascular disease it can be speculated that a dysregulation of CYP1A1 expression due to either or both R554K *AHR* polymorphism and/or T3801C *CYP1A1* polymorphism would lead to significant changes in vascular homeostasis and thus blood pressure.

We genotyped a group of French healthy volunteers for the T3801C and R554K polymorphisms to determine whether any of these polymorphisms cosegregate with blood pressure levels according to their smoking status.

MATERIALS AND METHODS

Individuals

The study population was selected from the French Stanislas cohort (1006 families) recruited at the Centre of Preventive Medicine in Nancy between 1994 and 1995 [15].

All participants were apparently healthy and were free from acute or serious chronic diseases such as cancer or ischaemic cardiopathies. Each individual gave written informed consent to participate in the study.

613 genetically unrelated individuals (302 men and 311 women) were selected according to the following criteria: (1) absence of medication that can affect blood pressure (antihypertensive, lipid-decreasing or anti-inflammatory drugs); (2) women were not pregnant; (3) there were no occasional smokers. Smoking status was categorized into three levels: never smokers, ex-smokers, and current smokers. The never smokers were those who had never smoked in their life. The ex-smokers were defined as those who had quit smoking at least one year before participation in the study. The current smokers were those who either were currently smoking or had stopped smoking within the previous year.

Clinical and biological data

Blood pressure was measured with a sphygmomanometer under standardized conditions (individual in the supine position). The values reported for systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure are the means of three measurements at each examination.

Height, weight and alcohol and tobacco consumption were recorded. Blood samples were collected from fasting individuals during their visit. These samples were used for measurements of classical biological profile. DNA extraction was performed at the time

the Stanislas cohort was recruited. Biological measurements and DNA extraction were performed with standardized methods [15]. The current smokers were asked to indicate with a structured questionnaire an average of how many cigarettes they smoked per day and ex-smokers an average over the lifetime smoking history.

Genotyping procedure

Genotyping of *CYP1A1* and *AHR* were done using the Kinetic Thermocycling (KTC) allele specific PCR method. KTC is based on the property of DNA polymerase to discriminate against primer/template mismatches occurring at the 3' end of a PCR primer [16]. Specific KTC assays were developed for detection of nucleotide changes 3801T>C *CYP1A1* and 1661 G>A *AHR*. Reactions were performed as described by Germer [16] with modest modifications. Briefly, final reaction volume was 20µl, concentration of primers was 0.2 µM and temperature of annealing was 56°C.

Statistical data

Statistical analyses were performed using SAS software version 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Hardy-Weinberg equilibrium was tested by a χ^2 test. Those who were heterozygous and those who were homozygous for the less frequent allele (C and A alleles) were pooled together for the analysis because of the small number of homozygote individuals for these alleles. Student's test was used to estimate the relationship between the gender and quantitative variables (SBP, DBP, age, and alcohol consumption) and χ^2 analysis was used for categorical variables.

A first multiple regression analysis was conducted separately for the systolic and diastolic blood pressure to determine the quantitative effects of each polymorphism and

of tobacco status. The variables BMI, age, pills for women, alcohol and tobacco consumption were included in the model.

In addition, a second multiple regression analysis was conducted to determine the quantitative effects of the interaction between tobacco status and polymorphism i.e. *CYP1A1* T3801C or *AHR* G1661A, with the same variables above. Finally, a third model was conducted to estimate the effect of interaction between the two polymorphisms and between the polymorphisms and the tobacco status. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Correction for multiple testing was made using a false discovery rate (FDR) controlling procedure [17]. In the FDR procedure, a new limit for statistical significance was calculated using the $[P(i) \leq (i/m)q]$ formula (with $q=0.05$, m =number of tests, and $1 \leq i \leq m$). 9 tests were used in the equation for testing the interaction between tobacco status and *CYP1A1* polymorphism, and $m=26$ for testing interaction between tobacco, *CYP1A1* and *AHR* polymorphisms.

RESULTS

Table 1 shows characteristics of the sample population. SBP and DBP were higher in men than in women ($p < 0.0001$). Total cholesterol, triglycerides and glucose levels, BMI and the percentage of current smokers were also higher in men than in women ($p < 0.0001$). Frequencies of the less frequent *CYP1A1* allele were 11.1% and 7.6% in men and women respectively. Frequencies of the less frequent *AHR* R554K allele were 13.1% and 10.6% in men and women, respectively. The observed genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 0.11$; $p = 0.74$ and $\chi^2 = 1.09$; $p = 0.30$ for *CYP1A1* and *AHR* respectively).

Mean blood pressure, after adjustment for age, BMI and alcohol intake and pills for women, are shown stratified by smoking status in Table 2. No significant difference between the three groups and BP was observed expected for DBP than seems to be less important in men smokers. Nevertheless the SBP and the DBP tend to be lower in current smokers than in non-smokers in both men and women.

Table 3 shows that after adjustment for age, BMI, pills for women and alcohol intake, men carrying the less frequent *CYP1A1* allele (TC and CC genotype) tend to have higher SBP and DBP than homozygous carriers of the frequent allele (TT genotype), ($p = 0.09$). SBP and DBP did not differ significantly in women, according to the genotype. Similarly, *AHR* genotype did not influence SBP and DBP neither in men nor in women (Table 3).

However, significant differences in SBP and DBP level according to the *CYP1A1* genotype were observed in ex-smokers after adjustment for gender, age, BMI, pills for women and alcohol intake ($p = 0.01$ and $p = 0.0069$ respectively) (figure 1).

The ex-smokers carrying the rare *CYP1A1* allele have a higher SBP ($p=0.04$ not confirmed after correction) and DBP ($p=0.0005$) than smokers carrying the rare *CYP1A1* allele.

Among *CYP1A1* *TT* homozygotes, SBP and DBP were significantly higher in the group of non smokers than in the group of smokers ($p=0.0069$ and $p=0.0016$ respectively).

Finally, ex-smokers and non smokers carrying the less frequent alleles of *CYP1A1* and *AHR* had the highest SBP and DBP than smokers (Figure 2).

DISCUSSION

This study was designed to investigate the influence of *CYP1A1* T3801C and *AHR* R554K polymorphisms on blood pressure in a French healthy population. The genotype distribution and the rare allele frequency were in accordance with those reported in a so-called “Caucasian population” [9]. Our hypothesis was that a dysregulation of *CYP1A1* expression due to these polymorphisms in *AHR* and/or *CYP1A1* genes would lead to significant changes in vascular homeostasis and thus blood pressure.

Our data revealed that both the systolic blood pressure (SBP) and the diastolic blood pressure (DBP) tend to be lower in current smokers than in non-smokers in both men and women. Although controversial, because of confounding factors, various studies already reported that both SBP and DBP of smokers were significantly lower than those of non-smokers, (see Okubo *et al*, for review) [18]. The effect of smoking habits on blood pressure is still unclear and poorly explained. One possible explanation is that *CYP1A1* activity is induced in smokers [19] and smoking-inducible *CYP1A1* activity is elevated in smokers. This enzyme biotransforms arachidonic acid and eicosapentaenoic acid into vasodilator compounds [20]. Another possibility, which does not involve *CYP1A1* enzyme is that smoking activates Rho-kinase in smooth muscle cells of vasculature, although the consequence on blood pressure is doubtful [21].

Higher SBP and DBP were observed in ex-smokers carrying the rare *CYP1A1* allele compared to the carriers of the frequent allele. Many epidemiological findings have led to the prediction of an increase in blood pressure as a consequence of smoking cessation in men [18,22], when smoking cessation reduces blood pressure in women [23].

Blood pressure in ex-smokers according to CYP1A1 polymorphisms

Our study emphasizes that individuals with the *CYP1A1* rare allele will have an increased risk of elevated blood pressure after smoking cessation ($p=0.01$ and $p=0.0069$ for SBP and DBP respectively). Moreover, significant differences in SBP and DBP level according to the *CYP1A1* genotype were observed in ex-smokers having quit smoking in the 5 last years before the examination ($p<0.0001$ and $p<0.001$ respectively) (data not shown). But this result needs confirmation in a larger sample.

There is some evidence that the *CYP1A1**2A variant may be associated with increased inducibility of the gene in response to exposure to environmental tobacco smoke [24].

Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility in subjects is correlated with the *MspI* polymorphism and specifically, the homozygote rare allele genotype shows much higher inducibility than the homozygote frequent allele genotype [25].

An increased cardiovascular risk associated with the rare *CYP1A1* allele and/or smoking status was also reported by Lança [26], who observed that the C allele is associated with stroke in Portuguese patients with hypertension, and by Wang [7,9], who reported an increased risk for triple vessel disease in the rare allele carriers, being light smokers.

Effect of AHR polymorphism on blood pressure

The *AHR* genotype appeared to be not associated with BP in the whole population studied. However, when the values of SBP and DBP were adjusted for age, sex, BMI and alcohol consumption and pills (for women only) the population stratified according to smoking status, we observed the higher SBP and DBP values in the group of ex-smokers and non smokers carrying both *CYP1A1* and *AHR* rare alleles (Figure 2).

AHR obviously contributes to blood pressure regulation as demonstrated in *AHR*-null mice which develop an elevation in arterial blood pressure as early as 2 months [14].

AHR-null mice also develop cardiac hypertrophy associated with increased expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) [27]. *AHR* is transcriptionally activated by cigarette smoke condensates [28]. However, until now the genotypic effect of the mutated *AHR* is poorly understood [13]. Although the number of subjects was low, our study indicated that carriers of both rare *CYP1A1* and *AHR* alleles exhibited the highest SBP when they quitted smoking or never smoked. This data tends to indicate that *AHR* contributes to the regulation of blood pressure via an interaction between the R554K polymorphism and the *CYP1A1* T3801C polymorphism. Indeed, Karyala [29] reported that smooth muscle cells of *AHR*-knock out mice respond in a very divergent way to classic inducers, when compared to wild-type mice cells. Namely, they observed that 107 genes respond differently to inducers between wild-type and *AHR* $-/-$ cells, including transforming growth factor-beta (TGF- β) and insulin-like growth factor-I (IGF-1). TGF- β and/or IGF-I signaling are being reported to contribute to the modulation of blood pressure [30, 31]. As a consequence of our finding, we suggest that these individuals with rare *CYP1A1* and *AHR* genotypes might need a specific health survey for preventing hypertension.

Cytochromes P450 as candidate genes in blood pressure regulation

Until now three different CYPs, namely *CYP2C9*, *CYP3A5* and *CYP4A11* have been reported as candidate genes in hypertension according to gender and ethnicity. Healthy control Chinese women have higher *CYP2C9**3 allele frequency than hypertensive women [32]. *CYP3A5**1 allele is more common in hypertensive black African-American individuals, but this allele does not contribute to blood pressure in Whites [33,34]. A loss of function variant of *CYP4A11* (8590C allele) is associated with hypertension in Whites [35]. Finally, we suggest that the *CYP1A1* by its T3801C

polymorphism and *AHR* R554K polymorphism could be considered as new markers involved in BP regulation.

Conclusion

Our study is the first to show that the interaction of *CYP1A1* T3801C and *AHR* R554K polymorphisms is associated with blood pressure increase in ex-smokers and non smokers. These findings emphasize the importance to study interactions between genetic polymorphisms, gender and environmental (smoking) factors.

Acknowledgments

This work was supported by an INSERM Grant: IDS (Interactions entre les déterminants de la santé). We thank the staff of Centre of Preventive Medicine of Vandoeuvre-lès-Nancy (FRANCE) for their involvement in the recruitment of the STANISLAS cohort. We are indebted to the families of the STANISLAS Survey, who made this study possible. The STANISLAS cohort study is supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladies des Travailleurs Salariés (CNAM), The Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Région Lorraine, the Communauté Urbaine du Grand Nancy and by Roche Molecular Systems (Alameda, USA).

References

1. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman J, Feyereisen R, Waxman DJ, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; **6**:1-42.
2. Perera FP. Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 1997; **278**:1068-1073.
3. Shimada T, Yun CH, Yamazaki H, Gautier JC, Beaune PH, Guengerich FP. Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol Pharmacol* 1992; **41**:856-864.
4. Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer-associated *MspI* polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J Biochem* 1991; **110**:407-411.
5. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Watanabe J. Individual differences in lung cancer susceptibility in relation to polymorphisms of P-450IA1 gene and cigarette dose. *Princess Takamatsu Symp* 1990; **21**:55-61.
6. Garte S. The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis* 1998; **19**:1329-1332.

7. Wang XL, Raveendran M, Wang J. Genetic influence on cigarette-induced cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2003; **45**:361-382.
8. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; **10**:1239-1248.
9. Wang XL, Greco M, Sim AS, Duarte N, Wang J, Wilcken DE. Effect of CYP1A1 *MspI* polymorphism on cigarette smoking related coronary artery disease and diabetes. *Atherosclerosis* 2002; **162**:391-397.
10. Cauchi S, Stucker I, Solas C, Laurent-Puig P, Cenee S, Hemon D, et al. Polymorphisms of human aryl hydrocarbon receptor (AhR) gene in a French population: relationship with CYP1A1 inducibility and lung cancer. *Carcinogenesis* 2001; **22**:1819-1824.
11. Kawajiri K, Watanabe J, Eguchi H, Nakachi K, Kiyohara C, Hayashi S. Polymorphisms of human Ah receptor gene are not involved in lung cancer. *Pharmacogenetics* 1995; **5**:151-158.
12. Smart J and Daly AK. Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2000; **10**:11-24.

13. Harper PA, Wong JY, Lam MS, Okey AB. Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem Biol Interact* 2002; **141**:161-187.
14. Lund AK, Goens MB, Kanagy NL, Walker MK. Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; **193**:177-187.
15. Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C, et al. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk : the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med* 1998; **36**:35-42.
16. Germer S, Holland MJ, Higuchi R. High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res* 2000; **10**:258-266.
17. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc Ser B* 1995; **57**: 289–300.
18. Okubo Y, Suwazono Y, Kobayashi E, Nogawa K. An association between smoking habits and blood pressure in normotensive Japanese men: a 5-year follow-up study. *Drug Alcohol Depend* 2004; **73**:167-174.

19. Zevin S, Benowitz NL. Drug interactions with tobacco smoking. An update. *Clin Pharmacokinet* 1999; **36**:425-438.
20. Schwarz D, Kisselev P, Ericksen SS, Szklarz GD, Chernogolov A, Honeck H, et al. Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid. *Biochem Pharmacol* 2004; **67**:1445-1457.
21. Noma K, Higashi Y, Jitsuiki D, Hara K, Kimura M, Nakagawa K, Goto C, Oshima T, Yoshizumi M, Chayama K. Smoking activates rho-kinase in smooth muscle cells of forearm vasculature in humans. *Hypertension* 2003; **41**: 1102-1105.
22. Lee DH, Ha MH, Kim JR, Jacobs DR Jr. Effects of smoking cessation on changes in blood pressure and incidence of hypertension: a 4-year follow-up study. *Hypertension* 2001; **37**:194-198.
23. Oncken CA, White WB, Cooney JL, Van Kirk JR, Ahluwalia JS, Giacco S. Impact of smoking cessation on ambulatory blood pressure and heart rate in postmenopausal women. *Am J Hypertens* 2001; **14**:942-949.
24. Georgiadis P, Topinka J, Vlachodimitropoulos D, Stoikidou M, Gioka M, Stephanou G, et al. Interactions between CYP1A1 polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations. *Carcinogenesis* 2005; **26**:93-101.

25. Kiyohara C, Hirohata T, Inutsuka S. The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene. *Jpn J Cancer Res.* 1996; **87**:18-24.
26. Lança V, Alcantara P, Braz-Nogueira J, Bicho MP. Cytochrome P450 (CYP1A1) T6325C polymorphism might modulate essential hypertension-associated stroke risk. *Rev Port Cardiol* 2003; **23**:343-355.
27. Thackaberry EA, Gabaldon DM, Walker MK, Smith SM. Aryl hydrocarbon receptor null mice develop cardiac hypertrophy and increased hypoxia-inducible factor-1alpha in the absence of cardiac hypoxia. *Cardiovasc Toxicol* 2002; **2**:263-274.
28. Meek MD, Finch GL. Diluted mainstream cigarette smoke condensates activate estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene transcription. *Environ Res* 1999; **80**:9-17.
29. Karyala S, Guo J, Sartor M, Medvedovic M, Kann S, Puga A, Ryan P, Tomlinson CR. Different global gene expression profiles in benzo[a]pyrene- and dioxin-treated vascular smooth muscle cells of AHR-knockout and wild-type mice. *Cardiovasc Toxicol* 2004; **4**:47-73.
30. Kuo WW, Chu CY, Wu CH, Lin JA, Liu JY, Hsieh YH, Ueng KC, Lee SD, Hsieh DJ, Hsu HH, Chen LM, Huang CY. Impaired IGF-I signalling of

hypertrophic hearts in the developmental phase of hypertension in genetically hypertensive rats. *Cell Biochem Funct* 2005.

31. Dahly-Vernon AJ, Sharma M, McCarthy ET, Savin VJ, Ledbetter SR, Roman RJ. Transforming growth factor-beta, 20-HETE interaction, and glomerular injury in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 2005; **45**:643-648.
32. Yu BN, Luo CH, Wang D, Wang A, Li Z, Zhang W, et al. CYP2C9 allele variants in Chinese hypertension patients and healthy controls. *Clin Chim Acta* 2004; **348**:57-61.
33. Ho H, Pinto A, Hall SD, Flockhart DA, Li L, Skaar TC, et al. Association Between the CYP3A5 Genotype and Blood Pressure. *Hypertension* 2005; **45**:294-298.
34. Givens RC, Lin YS, Dowling AL, Thummel KE, Lamba JK, Schuetz EG, et al. CYP3A5 genotype predicts renal CYP3A activity and blood pressure in healthy adults. *J Appl Physiol* 2003; **95**:1297-1300.
35. Gainer JV, Bellamine A, Dawson EP, Womble KE, Grant SW, Wang Y, et al. Functional variant of CYP4A11 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthase is associated with essential hypertension. *Circulation* 2005; **111**:63-69.

Table 1: Characteristics of sample population from the Stanislas cohort

	Men (n=302)	Women (n=311)	
Age (years)	39,1±7,4	36,8±7,5	<0,0001
SBP (mmHg)	125,5±10,4	117,9±10,5	<0,0001
DBP (mmHg)	75,5±8,8	71,1±8,7	<0,0001
Total Cholesterol (mmol/l)	5,75±1,04	5,50±0,87	<0,0001
Triglycerides (mmol/l)	1,21±0,73	0,90±0,58	<0,0001
Glucose (mmol/l)	5,17±0,48	4,88±0,40	<0,0001
Alcohol (g/day)	23,1±25,5	7,3±12,6	<0,0001
Body mass index (kg/m ²)	24,8±3,2	23,2±3,8	<0,0001
Smoking status			
Smokers (n, %)	131 (43,4%)	86 (27,7%)	
Ex-smokers (n, %)	70 (23,2%)	54 (43,6%)	
Non smokers (n, %)	101 (37,1%)	171 (62,9%)	<0,0001
Genotype CYP1A1 T3801C			
TT (n, %)	240 (79,5%)	265 (85,2%)	
TC (n, %)	57 (55,9%)	45 (14,5%)	
CC (n, %)	5 (1,7%)	1 (0,3%)	NS
Genotype AHR G1661A			
GG (n, %)	230 (76,2%)	251 (80,7%)	
GA (n, %)	65 (21,5%)	56 (18,0%)	
AA (n, %)	7 (2,3%)	4 (36,4%)	NS
Allele rare frequency			
CYP1A1 3801C (%)	11,1%	7,6%	NS
AHR 1661A (%)	13,1%	10,6%	NS

Values are mean ± SD or percentage. ^aStudent test or χ^2 test, men compared with women. SBP, DBP, systolic and diastolic blood pressures.

NS: non significant.

Table 2: Systolic and diastolic blood pressure according to smoking status.

		non smokers	smokers	ex-smokers	p ^a
SBP	men	126,6 (1,7)	124,9 (1,5)	130,1 (1,9)	0,10
	women	119,4 (1,3)	117,5 (2,0)	114,0 (2,3)	0,11
DBP	men	76,5 (1,5)	73,5 (1,3)	78,9 (1,6)	0,03
	women	72,1 (1,0)	70,3 (1,6)	68,2 (1,8)	0,14

Mean (Standard Error)

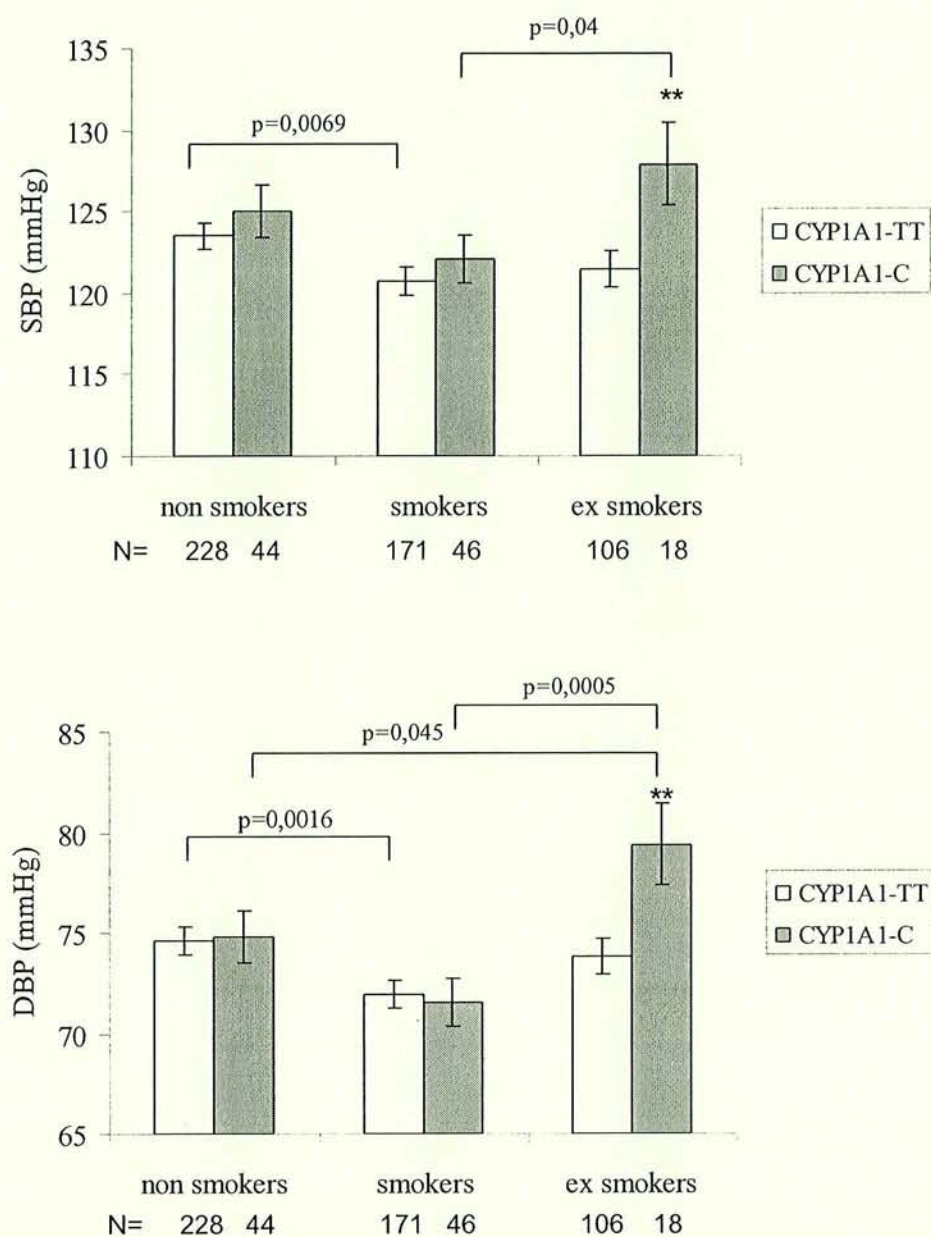
Systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures are adjusted for age, BMI, alcohol consumption (g per day), oral contraceptive for women. ^aAnalysis of variance.

Table 3: *CYP1A1* T3801C and *AHR* G1661A polymorphisms and blood pressure

	Men n=302			Women n=311		
	TT (n=240)	TC+CC (n=62)	p	TT (n=265)	TC+CC (n=46)	p
CYP1A1 T3801C						
SBP (mmHg)	126,3 (1,1)	130,0 (1,9)	0,09	116,6 (1,2)	120,0 (2,8)	NS
DBP (mmHg)	75,5 (0,9)	78,5 (0,9)	0,09	70,2 (1,0)	70,3 (2,2)	NS
	GG (n=230)	GA+AA (n=72)	p	GG (n=251)	GA+AA (n=60)	p
AHR G1661A						
SBP (mmHg)	127,8 (1,1)	125,2 (2,0)	NS	116,8 (1,3)	117,7 (2,4)	NS
DBP (mmHg)	77,0 (0,9)	74,1 (1,7)	NS	70,0 (1,0)	70,8 (1,9)	NS

Values are mean (Standard Error). Systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures are adjusted for age, BMI, alcohol consumption, and tobacco; NS: non significant.

Figure 1. SBP and DBP according to smoking status and *CYP1A1* T3801C genotype.



Legend

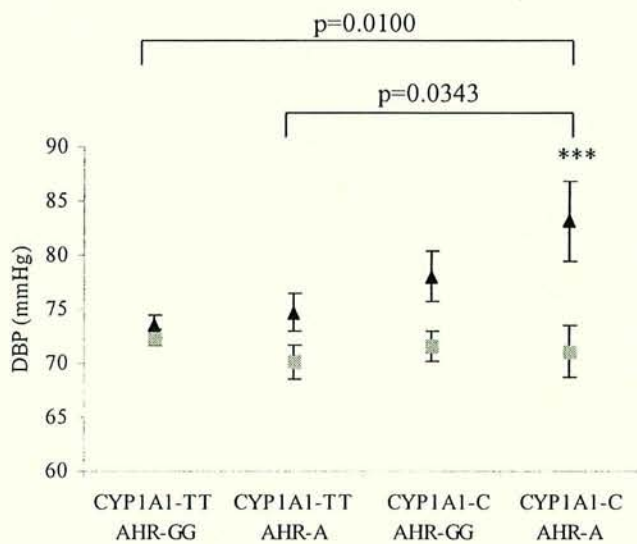
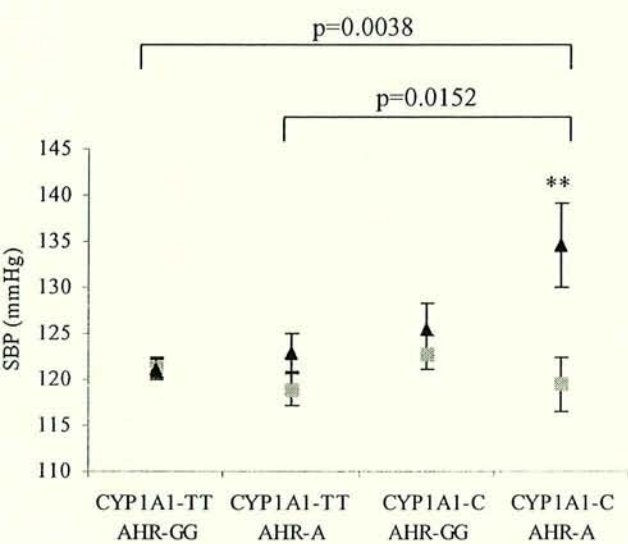
Mean $\pm$ standard error. Values adjusted for age, gender, BMI, alcohol consumption and pills (women only). N= number of subjects

** p<0.01

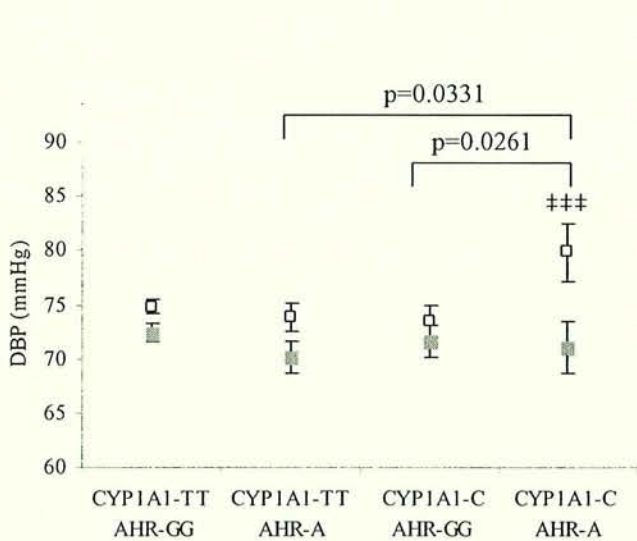
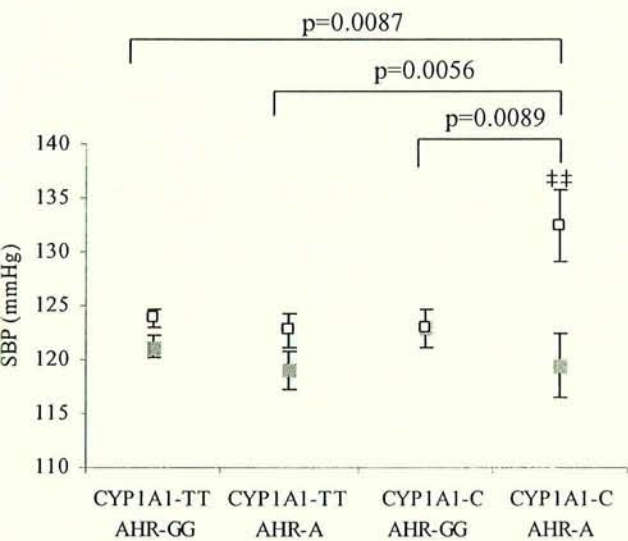
Figure 2. Association of *CYP1A1* T3801C and *AHR* G1661A genotypes with SBP and DBP adjusted for age, sex, BMI, alcohol consumption and pills (women only). Values are mean $\pm$ standard error

non smokers vs smokers (**p=0.0058, *** p=0.0060)

ex smokers vs smokers (‡‡p=0.0035, ‡‡‡ p=0.0137)



smokers ▲ ex smokers



smokers ■ non smokers

Conclusions et Perspectives

Chez un individu donné, le risque cardio-vasculaire est la résultante d'une composante génétique et d'une composante environnementale. Le nombre important des gènes polymorphes pouvant être impliqués dans les pathologies cardio-vasculaires, la grande fréquence et l'impact individuel faible des allèles de prédisposition ainsi que l'effet de certains facteurs d'environnement, imposent une approche complexe. Une stratégie d'étude doit permettre l'identification de nouveaux gènes candidats et la mise en évidence de nouveaux polymorphismes sans oublier les gènes qui sont impliqués dans le métabolisme des substances présentes dans l'environnement.

Le tabac est ainsi un des facteurs susceptible d'«affirmer» les effets d'un ou plusieurs polymorphismes génétiques et se comporte comme un modulateur de réponse. Différents polymorphismes, notamment celui des cytochromes P450 2A6 et P450 1A1, qui métabolisent certains composés du tabac, peuvent avoir des effets très divers sur les différents phénotypes qui sont affectés par le fait de fumer.

Notre travail a donc débuté par l'étude du gène *CYP2A6* impliqué dans le métabolisme de la nicotine afin de rechercher une corrélation entre les polymorphismes de ce gène, l'attitude tabagique et le nombre de cigarettes fumées.

Après génotypage du *CYP2A6* au sein de la cohorte STANISLAS, nous avons obtenus pour les polymorphismes *CYP2A6*1A*, *CYP2A6*1B* et *CYP2A6*4A*, des fréquences alléliques respectives de 64%, 32% et 4%. La comparaison des fréquences des allèles identifiés dans les populations de fumeurs, non fumeurs et ex-fumeurs n'apporte aucun élément en faveur d'une influence du polymorphisme du *CYP2A6* sur le statut tabagique.

Le principal résultat dans notre étude est une association significative entre les fumeurs homozygotes *CYP2A6*1B* et le nombre de cigarettes fumées par jour. Les individus porteurs du génotype *CYP2A6*1B/CYP2A6*1B* fument un nombre significativement plus élevé de cigarettes que les sujets génotypés *CYP2A6*1A/CYP2A6*1A*. Cette observation a été vérifiée à cinq ans d'intervalle et il a été observé que la plus importante augmentation de cigarettes fumées par jour durant cette période se retrouve chez les sujets homozygotes *CYP2A6*1B* comparés aux autres génotypes.

Le CYP2A6 est reconnu comme la voie principale d'oxydation de la nicotine en cotinine. L'étude du gène *CYP2A6* explique la variabilité interindividuelle de la rapidité à métaboliser la nicotine en cotinine et permet de trouver certaines relations entre plusieurs polymorphismes et les caractéristiques des fumeurs telles que le nombre de cigarettes fumées.

Le CYP1A1 enzyme impliquée dans le métabolisme des hydrocarbures polycycliques de la fumée de cigarette et son facteur de régulation le récepteur AhR, présentent des polymorphismes qui sont associés au cancer dû à la fumée de tabac et probablement aux maladies cardiovasculaires.

Le bon état de santé des individus appartenant à notre étude nous a permis d'étudier l'interaction tabac et polymorphismes *CYP1A1* T3801C et 1661G>A *AhR* sur la pression artérielle, en dehors de toute influence due à un état pathologique ou à un traitement médicamenteux.

Ainsi, cette étude a permis de montrer dans un premier temps que les pressions artérielles systoliques (PAS) et diastoliques (PAD) chez l'homme et la femme tendent à être plus basses chez le fumeur que le non fumeur. Mais l'argument selon lequel les fumeurs chroniques ont en moyenne une pression artérielle plus basse que les non fumeurs, ne diminue pas les effets dynamiques délétères de la consommation de tabac.

Dans un second temps, nos résultats ont mis en évidence une augmentation des PAS et PAD chez les anciens fumeurs possédant l'allèle rare *CYP1A1* comparés aux sujets porteurs de l'allèle fréquent. Les individus porteurs de l'allèle muté du gène *CYP1A1* auraient un risque plus élevé d'hypertension artérielle après arrêt du tabac et plus particulièrement quand ils ont cessé récemment de fumer.

AhR est un facteur important dans la régulation de CYP1A1 et son polymorphisme 1661G>A semble être associé à une induction plus élevée de l'activité CYP1A1. L'influence du polymorphisme génétique du récepteur AhR sur la régulation de la pression artérielle a été analysée dans un troisième temps.

- Le génotype *AhR* apparaît comme n'ayant aucune relation avec la pression artérielle dans notre population étudiée.

- Cependant, quand les valeurs des pressions artérielles systoliques et diastoliques sont ajustées en fonction de l'âge, du sexe, de l'IMC, de la consommation d'alcool et de la contraception orale chez la femme, les ex fumeurs et non fumeurs porteurs à la fois des allèles rares *CYP1A1* et *AhR*, ont les valeurs PAS et PAD les plus élevées.

Notre travail montre pour la première fois que l'interaction entre les polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* R554K est associée à une augmentation de la pression artérielle chez les non fumeurs et ex fumeurs. Ces résultats confirment l'importance d'étudier les interactions entre les polymorphismes génétiques et les facteurs environnementaux.

La modification de l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique telles que les cytochromes P450 a pour conséquence une modification de la production de métabolites vaso-actifs tels que les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) ou les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs). L'augmentation des cytochromes P450 et donc des métabolites vaso-actifs contribuerait à la dérégulation de l'homéostasie vasculaire.

Ces facteurs héréditaires ont un rôle dans l'excès d'activité de l'enzyme *CYP1A1* et représente un mécanisme physiopathologique impliqué dans les pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle. Le *CYP1A1* et son facteur de régulation *AhR* représenteraient de bons gènes candidats dans les maladies cardiovasculaires.

Dans la continuité de ce travail, nous pouvons envisager un certain nombre d'études :

L'ensemble des données sur le risque cardiovasculaire attribuable au tabac et les bénéfices à escompter de l'arrêt de sa consommation place le sevrage tabagique au tout premier plan des préoccupations médicales en termes de prévention cardiovasculaire. L'utilisation d'un médicament dans le sevrage tabagique est une aide incontestable.

- Les traitements nicotiniques de substitution permettent d'atténuer les troubles observés au cours du sevrage tabagique.

Dans une population de sujets en cours de sevrage, le polymorphisme génétique du cytochrome *CYP2A6*, métabolisant la nicotine, pourrait expliquer partiellement les variations d'efficacité des substituts nicotiniques selon les sujets pour des doses identiques.

L'étude de polymorphismes des gènes impliqués dans le mécanisme d'action des substances addictives du tabac comprenant les récepteurs de neurotransmetteurs (nicotiniques), ainsi que les réseaux de gènes impliqués dans le système de récompense cérébrale (voie dopaminergique) ou ceux qui la modulent (voies sérotoninergique et récepteurs aux opiacés, aux cannabinoïdes) peut être étendue aux sujets en cours de sevrage afin d'examiner la complexité des interactions gènes-gènes.

Cette recherche pourrait être poursuivie par l'étude d'un inhibiteur de l'activité CYP2A6 permettant de réduire la consommation de cigarettes et constituer une nouvelle approche thérapeutique.

- Le bupropion, antidépresseur qui bloque la recapture de la noradrénaline et partiellement de la dopamine, s'avère une aide efficace à l'arrêt de consommation de tabac. A l'arrêt de la « consommation » de nicotine, le fumeur aura un « supplément de dopamine » pouvant suppléer la dopamine « manquante » s'il est traité par le médicament. Le bupropion est métabolisé par le CYP2B6 en un métabolite, l'hydroxybupropion. L'étude des polymorphismes du gène *CYP2B6* dans une seconde population en sevrage tabagique par le bupropion pourrait expliquer partiellement les variations d'efficacité de ce médicament.

Il est bien établi que le risque cardiovasculaire augmente avec l'âge, l'étude ayant été menée auprès de sujets sains, il serait intéressant de suivre ces sujets afin d'observer l'évolution des maladies cardiovasculaires et plus particulièrement l'hypertension artérielle, en fonction des polymorphismes des gènes candidats et des réponses thérapeutiques.

La production de métabolites vaso-actifs de l'acide arachidonique dans les organes vasculaires ainsi que leur rôle dans la régulation du tonus vasculaire est bien documenté mais la variation de leur production résultant des polymorphismes des cytochromes P450 reste encore peu étudiée.

Il serait intéressant d'étendre l'étude à d'autres polymorphismes P450 impliqués dans le métabolisme de l'acide arachidonique et de doser les métabolites vaso-actifs afin de les corréler aux polymorphismes. Ces eicosanoïdes sont des phénotypes intermédiaires des pathologies cardiovasculaires, maillons intermédiaires dans le processus complexe reliant la variabilité d'un gène à la survenue de la pathologie.

Tous les individus ne sont donc pas égaux face au tabac. Ce travail met en lumière l'importance de l'interaction entre les variations génétiques des gènes P450 et les facteurs environnementaux tel que le tabac. Ces polymorphismes *CYP450* pourraient être considérés comme de nouveaux gènes candidats dans la dépendance au tabac et dans les maladies cardiovasculaires.

2.5. Article 3

“From Pharmacogenetics to Pharmacogenomics of antihypertensive drugs.”

Marteau JB, **Gambier N**, Jeannesson E, Batt AM, Siest G, Visvikis-Siest S.

Soumis à Pharmacogenomics.

From pharmacogenetics to pharmacogenomics of antihypertensive drugs

Jean-Brice MARTEAU, Nicolas GAMBIER, Elise JEANNESSON, Anne-Marie BATT*,

Gérard SIEST, Sophie VISVIKIS-SIEST

INSERM, U525, Equipe 4, EA 4003, Nancy, F-54000 France; Univ Nancy I, Nancy, F-54000 France;

Address for correspondence:

Dr Sophie Visvikis-Siest

INSERM U525 – Equipe 4, EA 4003

Faculté de Pharmacie

30 rue Lionnois

54000 NANCY – France

Phone: +33-3-83682184

Fax: +33-3-83321322

Email: Sophie.Visvikis-Siest@nancy.inserm.fr

Key Words: antihypertensive drugs, cardiovascular, genetics, pharmacogenetics, pharmacogenomics.

*This article is dedicated in memory of Professor Anne-Marie Batt

Abstract

Hypertension, a major risk factor for cardiovascular diseases, is difficult to control, blood pressure being under regulation through many metabolic systems.

Using the five steps pharmacogenomics approach for cardiovascular drugs we were essentially looking to find relevant pharmacokinetics and pharmacodynamics targets of antihypertensive drugs :

- β -blockers;
- Angiotensin Converting Enzyme inhibitors;
- Angiotensin Receptor blocking agents;
- Renin inhibitors;
- Diuretics;
- Calcium channel blockers;
- New drugs in development based on the involvement of the endothelial system

For all these drugs subclasses we tried to find relevant pharmacokinetic polymorphic genes including transporters and the pharmacodynamic targets relevant polymorphisms.

It is a field with high variability in the results obtained for different reasons :

- unpowered pharmacogenetics studies;
- no adequate selection of candidates genes;
- not enough knowledge of the genes functions at the physiological level;
- blood pressure is an integrative phenotype. We need endpoints i.e. peptides or proteins related to the metabolic cycle the drug wishes to control.

Finally pharmacogenomics and pharmacoproteomics studies of antihypertensives drugs have to account other important biological variability components : age, gender, hormonal status, nutritional habits, tobacco, overweight, ethical differences, interactions with endobiotics. These factors will contribute again to increase the size of the pharmacogenetic clinical trials. All the data obtained in such studies from DNA, RNA, plasma proteome should be integrated in metabolic systems and then simplified for giving to clinicians reduced data for useful application to personalized medicine.

Introduction

Hypertension (HTN) is a major risk factor for cardiovascular diseases responsible for 7.1 million deaths worldwide (13% of total deaths) in the year 2000 (World Health Report, 2002), and its prevalence increases with age to reach more than 70% among people 65 years and older. In 2005, the direct and indirect costs due to high blood pressure in United States were \$59.7 billion. Majority of hypertensive patients does not have their blood pressure controlled to target levels, indicating a clear need for new approaches to the management of hypertension.

Regulation of blood pressure (BP) is under many metabolic pathways control. It is a continuous variable, as cholesterol, and the decrease of BP to reach reference ranges is a clear therapeutic objective which could be obtained by tackling different pharmacological targets (Figure 1).

Indeed, despite availability of multiple antihypertensive drugs, acting on a variety of blood pressure (BP)-regulating systems, less than 40% of treated patients achieve BP control. One of the reasons could be that many genes have been proposed to be associated with blood pressure while their functional consequence was not estimated yet.

But also due to human biodiversity the obtained responses to the same drug for a group of people are very different. For example, in a group of 585 subjects [1], the administration of the common diuretic hydrochlorothiazide could decrease with high variability blood pressure while it is also able to increase BP in more than 5% of the subjects (Figure 2).

For this reason, as proposed previously for cardiovascular drugs in general, pharmacogenetic of antihypertensive drugs should follow the five steps strategy proposed by our group [2]:

- (1) Pharmacokinetic-related genes and phenotypes
- (2) Pharmacodynamic targets, genes and products
- (3) Cardiovascular diseases and risks depending on specific or large metabolic cycles
- (4) Physiological variations of previously identified genes and proteins
- (5) Environment influences on them

In addition BP in an integrated phenotype and progressively, peptidic or proteomic gene products could be better end points phenotypes [3].

Finally a lot of pharmacogenetic markers are issued from case-controls studies and we need to have as soon as possible genescan studies and more pharmacogenomic expression results i.e. through studies in white blood circulating cells. Total RNA from leukocytes could be obtained from untreated and treated patients [4], from individuals with different physio-pathological states such as obesity or hypertension [5] or from healthy subjects [6]. Main objective of these studies is to advance beyond selected candidate gene studies to entire genome assessment for as yet unknown genes defining hypertensive status or influencing antihypertensive drug responses. By identifying novel drug-response genes, the proposed pharmacogenomic studies have the potential to enable more effective tailoring of antihypertensive therapy in individual patients.

For all these reasons we are proposing in this review to describe for the different antihypertensive drug classes, the polymorphisms influencing the pharmacokinetics and pharmacodynamics, to add some recommendations for potential new drug and to discuss the three last part of the five steps strategy in the outlook.

Do not forget that pharmacogenetics was really put on the scene through an antihypertensive calcium inhibitor, perhexiline, which leads to a lot of deaths due at that time to our ignorance of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) poor metabolizer existence. In a latest review [7] summarising all the recent studies on pharmacogenetics of antihypertensive drugs, it appears that only a few of them deal with genes involved in pharmacokinetics. That is the reason why we will develop the pharmacokinetic aspect in each of antihypertensive treated class. Concerning Phase I enzymes, cytochromes P450 isoenzymes are members of a superfamily of monooxygenases that are responsible for the oxidative metabolism of more than half the drugs currently marketed. Among more than 30 human isoenzymes identified to date, the major ones responsible for drug metabolism include CYP3A4, CYP2D6, CYP1A2, and the CYP2C subfamily. As concern Phase II enzymes, it appears nothing relevant in the literature. It is to note that N-acetyltransferase 2 (NAT2) a phase II enzyme, affects the metabolism of hydralazine (a vasodilator previously used as antihypertensive drug), [8]. Transporters were not analysed in our knowledge in any studies. We propose here, for each antihypertensive class, transporters known to be responsible for antihypertensive drug transport.

1- Beta-blockers

Beta-blockers are used frequently for cardiovascular diseases. They are firstline therapy for the treatment of hypertension, heart failure, and angina in post-myocardial infarction patients. Several beta-blockers have been identified as substrates for CYP2D6 (Table 1). Today, CYP2D6 is the most polymorphic among all cytochromes (CYPs) with more than 75 genetic variations described [see 100]. These variants result from point mutations, deletions or additions, gene rearrangements, and deletion or duplication of the entire gene and result in a variation of CYP2D6 activity. According to several mutations, CYP2D6 activity can be

classified as: poor metabolizers (PMs), intermediate metabolizers (IMs), extensive metabolizers (EMs) and ultrarapid metabolizers (UMs). Drugs for which metabolism is highly dependant on CYP2D6 activity, PMs may have a larger response and may be at greater risk of toxicity than EMs. As regards beta-blockers drugs such as metoprolol and carvedilol, pharmacokinetic studies have demonstrated that *CYP2D6* genotype were correlated with differences in plasma drug concentrations. Nevertheless, there was no association between *CYP2D6* genotype and beta-blockers-induced adverse effects or efficacy [9-11]. The wide therapeutic range of beta-blockers may explain why it is well tolerated in the majority of CYP2D6 PMs and suggest that a priori CYP2D6 genotyping can not be recommended for routine use in the setting of beta-blocker treatment. It is to note that some beta-blockers also have low affinity for CYP3A4.

ABCB1 is often colocalized with CYP3A in numerous pharmacological barriers, which indicate a coordinate defense mechanism against xenobiotics. They also share numerous substrates, including beta-blockers. MDR1, the gene coding for ABCB1 protein is highly polymorphic and numerous polymorphisms have been associated with either expression or activity variations. Meanwhile, it appears that ABCB1, also known as P-glycoprotein or P-gp, does not participate to beta-blockers pharmacokinetics in a relevant way. However, cautions should be taken in the case of co-administration of a drug that is an ABCB1 inhibitor.

From a pharmacodynamic point of view, adrenergic receptors (subtypes alpha 1, alpha 2, beta 1 and beta 2) are components of a prototypic family of guanine nucleotide binding regulatory protein-coupled receptors that mediate the physiological effects of the hormone epinephrine and the neurotransmitter norepinephrine. Two major polymorphisms encoded by the beta-1 adrenergic receptor gene are commonly used in both hypertension and heart failure pharmacogenetic studies of beta-blockers (Figure 3). These polymorphisms result in an amino acid substitution at codon 389 (Arg389→Gly) (C1165G polymorphism) that codes for

intracellular part of the receptor and at codon 49 (Ser49→Gly) (A145G polymorphism) that codes for extracellular part of the receptor.

Several studies, but not all, have reported a greater effect of beta-blockers in 1165C homozygotes [12-14]. Consideration of haplotypes could explain approximately more than 40% of the variability in blood pressure response to metoprolol monotherapy than consideration of the codon 389 polymorphism alone [13]. These polymorphisms could however not explain the changes in heart rate and blood pressure to treatment with atenolol (50-100 mg) [15].

Two recent studies investigate the local vascular responses in humans triggered by a highly selective alpha 2 -adrenergic agonist [16, 17]. Responses to azepexole [B-HT 933] show prominent differences as a function of age and gender but appear not to depend on common allelic variations at the ADRA2B receptor [16]. In contrast, the ADRA1A Arg347Cys polymorphism seems to be associated with the BP therapeutic response in patients with 150 mg of irbesartan [17].

Studies using microarray genotyping have also reported significant pharmacogenetic effects with beta-blockers in G-protein subunit genes, adducin or endothelin gene. Thus, a pharmacogenetic effect of the GNB3 (C825T polymorphism) with atenolol was shown in males [18]. Liljedahl [19] reported the ADRA2 A1817G polymorphism predicted the change in left ventricular mass during antihypertensive therapy with atenolol. Kurland [20] found that carriers of the *ADD1* -6A and 1198C alleles have a significant decrease in blood pressure with atenolol. Finally, men carrying the T-allele of the G5665T gene polymorphism of preproendothelin-1 gene responded on average with a more than two-fold greater reduction than those with the G/G genotype (-21.9 mmHg 13.9] vs. -8.9 [2.3], $p = 0.007$) [21]. Recent pharmacogenetic studies in hypertension involving adrenergic genes are summarized in Table 2.

2- Renin-angiotensin system

Tremendous efforts have been directed toward the understanding of the renin-angiotensin system (RAS) and its implication in the control of blood pressure and sodium balance (Figure 4). Genetic variations of genes corresponding to this system were shown to be associated with susceptibility to high blood pressure. These observations make the RAS genes under intense investigation, and they represent a major target for antihypertensive drugs mainly represented by angiotensin receptor blockers (ARBs); vasopeptidase inhibitors (VPIs); and beta adrenoceptor blockers. Major pharmacogenetic studies involving RAS since 2003 are summarized in Table 3.

3. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors or ACE inhibitors

Nothing relevant appears concerning ACE inhibitor activity and polymorphisms in drugs metabolising enzymes or transporters. CYP2C9 and CYP2D6 contribute to ACE inhibitors metabolism (Table 1). In a rat model, numerous uptake carrier systems could transport ACE inhibitors. For example, enalapril is a substrate for OATPs and enalaprilat (active metabolite of enalapril) and quinalapril for PEPT [22].

Angiotensin converting enzyme (ACE) enzyme or kininase II is a carboxypeptidase known to play an important role in blood pressure regulation and electrolyte balance by hydrolyzing the inactive peptide angiotensin I to the biologically active peptide angiotensin II, a potent vasopressor, and aldosterone-stimulating peptide. In addition, ACE is also able to hydrolyze bradykinin, a potent vasodilator, to inactive products. Thus, ACE gene is the most commonly studied in ACE and ARB pharmacogenetic investigations and the ACE I/D polymorphism, corresponding to an insertion or deletion of a 287 bp *Alu* repeat polymorphism in intron 16 of

the angiotensin-converting enzyme gene [23] has been a candidate polymorphism for the majority of *ACE* pharmacogenetic investigations. Valsartan and captopril have proved to be successful in the treatment of hypertension and related target-organ damage [24]. However, despite promising functional data and high variant allele frequency, pharmacogenetic studies have been inconsistent regarding this polymorphism. Several earlier studies in hypertension implicated the D allele with enhanced drug response [25, 26] while the ACE I/D polymorphism failed to predict BP change in response to ACE inhibitors [27], and that several other investigations showed the I allele could be associated with greater or lack of drug response [28-30].

In truth, only higher doses of ACE inhibitors seemed to diminish the impact of the ACE-D allele whereas the benefits of beta-blockers and high-dose ACE inhibitors appeared maximal for DD patients [31]. Therefore, these results support the justification for further evaluation in appropriately powered studies, particularly by increasing the number of subjects and by giving details of co-medication if necessary.

Angiotensin-receptor blockers (ARBs) or Sartans

CYP2C9 plays a role in the metabolism of angiotensin II receptor antagonists (Table 1). Some allelic variants have been reported with impaired activity of CYP2C9 enzyme (Figure 5). CYP2C9*5, *6, and *11 variants have mostly been found in different African populations whereas CYP2C9*2 and *3 alleles are the dominant variants in white populations [32]. CYP2C9*2 and *3 alleles have been shown to be responsible for the poor metabolizer phenotype. Thus, individuals harbouring these polymorphisms, particularly homozygous variant individuals, should require lower doses of active drugs, which are well established for anticoagulant therapy. Hallberg et al. found that CYP2C9 genotype predicts blood pressure decrease in response to irbesartan therapy [33]. In fact, CYP2C9*2 allele carriers seems to

have larger DBP decrease in response to irbesartan than CYP2C9*1 allele carriers. Moreover, losartan is an inactive prodrug, activated by CYP2C9 metabolism. CYP2C9 *3 allele have been associated with decrease response to losartan in one single study [34]. CYP2C9 genotyping should be considered at the first sign of severe hypotension after angiotensin-receptor antagonists administration so that the treatment regimen can be adjusted in a timely manner and further deleterious effects avoided.

As concern phase III proteins, nothing is relevant concerning Angiotensin Receptor Antagonists activity and transporters.

Angiotensin receptor blockers (ARBs) provide a complete and specific suppression of the renin-angiotensin-aldosterone system. ARBs low blood pressure by blocking the binding of Angiotensin II (Ang II) to the angiotensin type I (AT₁) receptor, independent of the pathway of Ang II generation [35]. In addition, ARB administration indirectly activates the AT₂ receptor by blocking feedback inhibition of renin release and shunting the angiotensin II so generated from AT₁ to AT₂. ARBs have already proven to be successful treatments for hypertension and heart failure. The first angiotensin receptor blocker to be approved in the United States for the treatment of heart failure was valsartan. At present, seven ARBs are available; the last was olmesartan, a new non-peptide angiotensin (A) II antagonist [36].

The A1166C angiotensin II type I receptor (AT1R) was investigated in relation with AT1R blockade. Blood pressure responses to an active metabolite of losartan were significantly blunted in CC genotype patients compared to patients with the AA genotype [37], suggesting that hemodynamic response to AT1R blockade are in part depend of this polymorphism. The relationship between the AT1R A1166C polymorphism and the therapeutic response to losartan was also supported by Sookoian et al. [38] in patients with cirrhosis and portal hypertension. Although, more investigations are needed, present results could suggest that genetic testing may be used as predictive factor of response to losartan.

Renin inhibitor and pharmacogenetics

Renin is a protease that is synthesized by the kidney and cleaves angiotensinogen to produce the decapeptide angiotensin I. Overexpression of renin and its metabolic products predisposes individuals to developing hypertension and related target-organ damage. In this way, efforts have been done to produce renin inhibitors for clinical use. Old peptidic and peptidomimetic renin inhibitors had problems with oral bioavailability and high costs of synthesis. Fortunately, recent works have led to the synthesis of a potent non-peptidic inhibitor of renin, aliskiren (SPP-100), which has acceptable oral bioavailability [39], and that has been shown in early trials to be similar in efficacy and tolerability to losartan [40] and irbesartan [41]. Aliskiren seems to offer the prospect of highly effective RAS inhibition for the treatment of hypertension and could be a promising drug. However, the lack of pharmacogenetic studies investigating aliskiren effects in carriers of the most prominent renin polymorphism (Arg387→term) require further attention although this polymorphism failed to predict BP response to 25 mg-hydrochlorothiazide diuretics [42].

3- Diuretics

Vormfelde et al. [43] proposed a list of candidate genes possibly relevant for inter-individual variability in diuretic drug pharmacokinetics and pharmacodynamics. We detail here some of them.

Diuretic pharmacokinetics is dependent on intestinal uptake, liver metabolism, blood transport and, above all, renal elimination. It is also dependent of metabolism by cytochromes (Table 1). For example, the loop diuretic drug torasemide pharmacokinetics differs significantly between subgroups with different CYP2C9 genotypes. Particularly among CYP2C9*3 carriers although the clinical impact still need to be explored [44]. Glucuronidation is responsible for the inactivation of almost all loop diuretics. UGT1A8, which is polymorphic,

has been implicated in furosemide glucuronidation but clinical impact is still not demonstrated. Genes coding for transporters, especially renal transporters, may be more relevant (Table 1). Thus, OAT1, OAT3, and OAT4 are responsible for excretion of some thiazides and loop diuretics. In contrast to these anionic diuretics, the cationic K⁺ sparing-diuretics are substrates for OCT2. Ala270Ser polymorphism and variants in the promoter region of OCT2 could be of clinical relevance and clinical studies are needed. An exception is the active metabolite parahydroxytriamterene sulfate, excreted via OAT3, which could lead to significant interactions. Finally, ABCB1 allowed the transport of aldosterone antagonists such as spironolactone.

Body's handling of salt has an important effect on cardiovascular status, and recent evidence strongly supports the use of thiazide diuretics, as first-line therapy for hypertension and coronary heart disease prevention [45•]. In addition to the high number of sites of action of diuretics, including proximal and distal tubules, loop of Henle and collecting duct, diuretics are also able to act on other systems (e.g. renin-angiotensin system). Among several pharmacogenetic associations of polymorphisms with diuretics, alpha-adducin (ADD1) Gly460Trp polymorphism was the most widely investigated.

Indeed, the significant linkage of the α -adducin locus to essential hypertension and greater sensitivity to changes in sodium balance among hypertensive patients suggest that genetic polymorphism of α -adducin is associated with a salt-sensitive form of essential hypertension and may help identify hypertensive patients who will benefit from diuretic treatment or who will be on a diet to reduce total body sodium [46]. The Gly460Trp polymorphism has been associated with renal sodium reabsorption and salt-sensitive hypertension in several studies although the definition of this variant as a predictive marker in response to antihypertensive therapy is uncertain. However, the Gly460Trp polymorphism was not found associated with

statistically significant differences in BP responses to hydrochlorothiazide [47]. In truth, magnitude of blood pressure response to diuretics could be under the influence of the both 460Trp ADD1 and DD ACE genotypes [46, 48, 49]. Indeed, interaction between adducin and ACE genes [50•] could explained the lack of BP-lowering response in patients that were only genotyped for the 460 Trp variant. Recently the interaction of alpha-adducin Gly460Trp and ACE I/D polymorphisms was found to play a significant role in regulating baseline BP but not BP response to benazepril [51].

Other pharmacogenetic studies, less frequent than those with thiazides, include loop diuretic and potassium-sparing diuretics. It was shown that carriers of the Trp460 allele had a greater blood pressure decrease to the handle diuretic furosemide than frequent homozygotes [46].

The benefit of potassium-sparing diuretics including amiloride and spironolactone seems to be highly dependent of the targeted gene. The apical (outward-facing) membranes of high resistance epithelia that contain Na^+ channels were identified by their sensitivity to block by the K^+ -sparing diuretic amiloride. Rare monogenetic disorders associated with hypertension have been described, such as Liddle syndrome, in which mutations in the epithelial sodium channel gene lead to an increase of renal sodium reabsorption. Thus, the Thr594Met polymorphism of the ENaC beta-subunit gene that occurred in 6-8% of people of African origin was significantly associated with high blood pressure. In a controlled study including black hypertensives carrying the Thr594Met variant, 10 mg of amiloride was found to be effective in controlling blood pressure alone as soon as combined with thiazide [52]. However, in a blinded population-based study of amiloride efficacy, the diuretic would not be very effective, because it would only reduce blood pressure in ~2.5% of the individuals. This small number would be diluted when mean population blood pressure measurements were derived. When translated into practice, this means that amiloride is not considered as a first-

option antihypertensive. This state of affairs means that a more precise identification of individuals who can benefit from amiloride therapy is required.

Finally, benefits of the spironolactone or epleronone drugs should also be discussed. According to the previously described interaction between ACE I/D and Gly460Trp polymorphisms, the benefit of spironolactone was shown to be confined to *ACE* I allele carriers [53]. However, benefit of epleronone or spironolactone failed to predict BP response of the T-344C aldosterone synthase polymorphism that seems to be more predictive of the antihypertensive effect of angiotensin II receptor antagonists [54, 55].

4- Calcium channel blockers

CYP3A enzymes metabolize almost 50% of all drugs on the market. In adults, the CYP3A subfamily consists of CYP3A4 and CYP3A5. CYP3A4 is abundantly expressed in the liver and small intestine of all individuals. CYP3A5 is also expressed in these tissues and in the kidney but only among 30% of Whites and 70% of Blacks who possess more than one CYP3A5*1 allele. CYP3A enzymes are under the influence of genetic variation but CYP3A4 alone can not fully explain the observed constitutive variability because its genetics variants are relatively uncommon and have limited functional significance, whereas CYP3A5 expression in humans is highly variable and may be contributory [56]. During the last decade, 11 different CYP3A5 allelic variants have been identified.

CYP3A is known to metabolize almost all calcium channel blockers (Table 1) but it is difficult to delineate the relative contribution of CYP3A4 and CYP3A5, and to differentiate their effects on drug metabolism as their structure, function and substrates are so similar. CYP3A5 indicated a large degree of contributions to the diltiazem N-demethylation [57]. Recently, Yamamoto *et al.* [58] reported that *CYP3A5*3* (22893, G>A), mutant allele result

in splicing defects and produce CYP3A5 protein with no enzymatic activity, has only a minor effect on the pharmacokinetics and metabolism of diltiazem. Although CYP3A5 polymorphisms are thought to be responsible for the individual variation of CYP3A activity *in vitro*, their clinical impact is unclear and remains to be examined further.

In the particular case of diltiazem, CYP2D6 enzyme may significantly alter the disposition of its metabolites but we still don't know the clinical impact of this observation. Finally, the human CYP1A2 has been shown to be involved in the metabolic of the calcium channel blockers verapamil. Genetic variation in CYP1A2 has been reported to be responsible for decreased enzyme activity. Verapamil has a large therapeutic index so genetic polymorphism in *CYP1A2* is of negligible clinical consequence. And more over, the substrate can be effectively metabolized by an alternative route, the CYP2C8 or CYP3A pathways.

Several calcium antagonists are extruded by ABCB1 transporter. The impact in activity of calcium antagonists is not well studied. According to Meisel et al. [59], the ABCB1 genotype may alter drug-related side-effect. Indeed, ABCB1 G2677T/A polymorphism was shown to be associated with the risk of gingival hyperplasia induced by calcium antagonists. Finally, some of these calcium antagonists are both substrates and inhibitors, or inducers, of ABCB1. Thus, co-administration of a calcium antagonist, like verapamil, and another ABCB1 substrate, such as tricyclic antidepressant, can lead to variation in the bioavailability of this other substrate.

Identification of sequence variability in the genes for calcium pathways i.e. Ca^{2+} -sensitive K^+ channel beta 1 subunit recently defined as protective against hypertension [60] need to be improved. In this way, *in vitro* studies to test functional significance of polymorphisms (patch-clamp studies in the example of calcium channel) and determine the association between drug's antihypertensive effect and genetic polymorphisms are of interest. The E65K polymorphism in the $[\text{beta}]_1$ -subunit of the large-conductance, Ca^{2+} -dependent K^+ (BK)

channel, a key element in the control of arterial tone, has recently been associated with low prevalence of diastolic hypertension [61]. However, antihypertensive treatment with dibutyril cGMP was not able to modify the K allele effect on DBP [62].

5- New drugs

Many different targets acting on the endothelial system are under investigation (Figure 6). From a prospective point of view, they should include pharmacogenomics as early as possible.

Endothelin antagonists

Endothelin (ET), a highly potent vasoconstrictor, has led to considerable efforts to develop antagonists of endothelin receptor that could have therapeutic potential in hypertension. Effects of ET are mediated by binding to cell-surface receptors that belong to the superfamily of rhodopsin-like-G-protein-coupled receptors (GPCRs). A pharmacogenetic study including 102 hypertensives genotyped for the Lys198Asn polymorphism (G5665T) showed that for both atenolol 50-100 mg and irbesartan 150-300 mg men carrying the T5665-allele have a two fold decrease in SBP than GG homozygotes [21] – Table 5.

Nitric oxide blockers and phosphodiesterase inhibitors

Nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine by nitric oxide synthases (NOS) (Figure 6). This lead to produce three isoforms named according to their tissue location: endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) and inducible/inflammatory NOS (iNOS). A missense variation Glu298Asp in exon 7 could contribute to explain resistance of patients to conventional antihypertensive therapy (including diuretics, beta-blockers, and calcium antagonists) [63]. Moreover, GG of Glu298Asp showed greater DBP reduction in response to

25 mg of hydrochlorothiazide [47] – Table 5.

Inhaled nitric oxide was regarded as the gold standard therapy in the treatment of pulmonary hypertension (PH). However, because efficacy response is only about 70%, a number of recent studies have investigated and suggested a role for specific phosphodiesterase (PDE) inhibitors (sildenafil, vardenafil, and tadalafil) in the management of PH. Sildenafil that could inhibit phosphodiesterase type 5, an enzyme that metabolizes cyclic guanosine monophosphate, thereby enhancing the cyclic guanosine monophosphate-mediated relaxation and growth inhibition of vascular smooth-muscle cells, including those in the lung was recently shown to improve exercise capacity, WHO functional class, and hemodynamics in patients with symptomatic pulmonary arterial hypertension [64]. Because, the response to sildenafil (25 to 100 mg) was previously found to be significantly associated with GNB3 C825T genotype status in patients with erectile dysfunction [65], we encouraged to develop new pharmacogenetic studies using this oral phosphodiesterase-5 inhibitor.

RNA interference

RNAi appear to be a specific and natural mechanism of mRNA silencing. They are efficient, and their simple and low-cost synthesis could lead to propose RNAi as golden drugs in the next 20 years. Four major nucleic acid methods for target modulation were described: ribozymes, antisense oligonucleotides, aptamers and RNA interference.

The hybridized antisens oligodeoxunucleotides (AS ODN) complex prevents a specific mRNA from translating its message into a cellular protein product. Effective (AS ODN), i.e. short phosphothioated oligomers with lack of toxicity and long duration have been targeted to mRNA for renin, angiotensinogen, ACE and AT1R. The most recent finding was an AS ODN directed against a novel angiotensinogen mRNA-stabilizing protein able to reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats [66•]. Similarly, inhibition of the generation of

the $\alpha 2B$ -AR was previously shown to decrease BP in salt-induced hypertensive rats [67]. At last, a decreased endothelin converting enzyme (ECE) 1 expression after ECE siRNA treatment was shown to reduce cell proliferation [68]. Other pharmacogenetic studies are required to propose new gene targets and select best drug responders.

6- Outlook

The effect of genetics on disease susceptibility and hypertensive drug treatment has been studied quite extensively; however, hardly any of these studies are at present reflected in routine health care. The major reason could be imputable to the frequent bad design of studies generating discordant and consequently inconclusive results that lead to propose precociously a gene as “candidate”.

More and more studies include large number of subjects contributing to increase statistical power. However, this effort needs to be extended from prospective, retrospective or case/control studies to pharmacogenetic studies. The choice of candidate gene needs to be considerably improved by focusing not only on the current basis of genetic information, but also by integrating transcriptomic and proteomic approaches. Moreover, in spite of numerous traditional candidate genes involved in cardiovascular disorders, their contribution in blood pressure (BP)-response to drugs is still small. Thus, in a complex multifactorial disease as hypertension, we need to screen for the complete genome for identify new genes; characterize genetic variation within, to finally discover additional novel genetic pathways influencing drug response. Then strategy based on a total genome scan and pharmacogenetic study designed to search for genetic determinants of BP as it was already shown in rodents [69], should be further extended in human [70●].

Traditional genotype approach were based on the analysis of only one or two single nucleotide polymorphisms (SNP) and one gene as separate entities, with the aim of finding significant associations that may identify or lead to functional mutations. Future investigations need to consider not only polymorphisms but also their reliable haplotype structure in large samples. Indeed, haplotype analysis will improve the functional relevance of polymorphisms, for example by revealing an opposing interaction between them, which may help to explain previous association inconsistencies. Both of these strategies will help to propose a better selection and definition of “candidates”.

In the new drug candidates, it will be of importance to consider regulation factors. Indeed, CYP3A and CYP2C are regulated at the transcriptional level by diverse transcription factor families namely Glucocorticoid Receptor (GR), Constitutive Androstane Receptor (CAR) and Pregnane X Receptor (PXR) families. PXR also enhances ABCB1 expression. The genes coding for these regulation factors are polymorphic and could influence CYP450 and ABCB1 related pharmacokinetics.

Power of studies need also to be enhanced by replacing usual blood pressure endpoints measurements (that represent a high variability) by better outcome markers i.e. proteins with not too short plasma half life. Therefore, used independently as indicators or in combination to produce a pattern profile, biomarkers can reflect a variety of disease characteristics, including the level of exposure to an environmental or genetic trigger.

The improvement of BP-response to drugs is dependent of other biological variability factors (hormonal status, nutritional habits, tobacco ...) that we do not enough take into account. To summarize, investigations have to include the genotyping of samples from hypertensive, normotensive, of young and elderly populations particularly because physiology of elderly patients is different from adults or young people. Gender, environment and ethnic differences were also known to contribute in the variability of BP-response to antihypertensive drugs. As

an example, Trotta et al., [71] remind us that Caucasians would be less responsive to diuretics and calcium-channel blockers and more responsive to β -blockers and ACE inhibitors than African Americans. Nevertheless, another aspect better less known and that should require our attention in future, is the role of the microbiome in cardiovascular diseases (CVD). Reports suggest the influence of endobiontes in the risk of CVD through modification of classical risk factors such as obesity, insulin resistance and plasma lipids [72]. Thus, metabonomics should include the increasing list of other “-omics” to define a better model of integrated biological system. Confident with this strategy, the huge of data generated by using high-throughput techniques to quantify changes in the genome, transcriptome, proteome and metabolome in response to a given drug should improve the practice of personalized medicine.

REFERENCES

1. Schwartz GL, Turner ST: Pharmacogenetics of antihypertensive drug responses. *Am J Pharmacogenomics* 4(3), 151-160 (2004). • A very well and structured review in the field.
2. Siest G, Jeanneson E, Berrahmoune H, et al.: Pharmacogenomics and drug response in cardiovascular disorders. *Pharmacogenomics* 5(7), 779-802 (2004). ••This review evokes variability in response to CV drug treatment that can emerge from pharmacokinetics, pharmacodynamics, pathologic modifications, physiologic regulation and environmental interactions.
3. Siest G, Marteau JB, Maumus S, et al.: Pharmacogenomics and cardiovascular drugs: need of integrated biological system with phenotypes and proteomic markers. *Eur J Pharmacol.* 527, 1-22 (2005).
4. Chon H, Gaillard CA, van der Meijden BB, et al.: Broadly altered gene expression in blood leukocytes in essential hypertension is absent during treatment. *Hypertension* 243, 947-951 (2004).
5. Philip-Couderc P, Smih F, Pelat M, et al.: Cardiac transcriptome analysis in obesity-related hypertension. *Hypertension.* 41, 414-421 (2003).
6. Visvikis-Siest S, Marteau JB, Samara A, et al.: Gene expression in lymphocytes: a promising strategy for cardiovascular biological systems investigations. *Pharmacogenomics* 2006 submitted.
7. Arnett DK, Claas SA, Glasser SP : Pharmacogenetics of antihypertensive treatment. *Vascul Pharmacol.* 44(2), 107-118 (2006).
8. Mellen PB, Herrington DM: Pharmacogenomics of blood pressure response to antihypertensive treatment. *J Hypertens.* 23(7), 1311-1325 (2005).
9. Zineh I, Beitelshes AL, Gaedigk A, et al.: Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clin Pharmacol Ther.* 76(6), 536-44 (2004).
10. Fux R, Morike K, Prohmer AM, et al.: Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: a prospective clinical study. *Clin Pharmacol Ther.* 78, 378-387 (2005).
11. Terra SG, Pauly DF, Lee CR, et al.: beta-Adrenergic receptor polymorphisms and responses during titration of metoprolol controlled release/extended release in heart failure. *Clin Pharmacol Ther.* 77, 127-137 (2005).
12. O'Shaughnessy KM, Fu B, Dickerson C, Thurston D, Brown MJ: The gain-of-function G389R variant of the beta1-adrenoceptor does not influence blood pressure or heart rate response to beta-blockade in hypertensive subjects. *Clin Sci (Lond).* 99(3), 233-238 (2000).
13. Johnson JA, Zineh I, Puckett BJ, McGorray SP, Yarandi HN, Pauly DF: β 1 adrenergic

receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol. *Clin Pharmacol Ther* 74, 44-52 (2003).

14. Sofowora GG, Dishy V, Muszkat M, et al.: A common beta1-adrenergic receptor polymorphism (Arg389Gly) affects blood pressure response to beta-blockade. *Clin Pharmacol Ther* 73, 366-371 (2003).

15. Karlsson J, Lind L, Hallberg P, et al.: Beta1-adrenergic receptor gene polymorphisms and response to beta1-adrenergic receptor blockade in patients with essential hypertension. *Clin Cardiol.* 27, 347-350 (2004).

16. King D, Etzel JP, Chopra S, et al.: Human response to alpha2-adrenergic agonist stimulation studied in an isolated vascular bed in vivo: Biphasic influence of dose, age, gender, and receptor genotype. *Clin Pharmacol Ther.* 77, 388-403 (2005).

17. Jiang S, Mao G, Zhang S, et al.: Individual and joint association of alpha1A-adrenergic receptor Arg347Cys polymorphism and plasma irbesartan concentration with blood pressure therapeutic response in Chinese hypertensive subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 78, 239-248 (2005).

18. Filigheddu F, Reid JE, Troffa C, et al.: Genetic polymorphisms of the beta-adrenergic system: association with essential hypertension and response to beta-blockade. *Pharmacogenomics J.* 4, 154-160 (2004).

19. Liljedahl U, Kahan T, Malmqvist K, et al.: Single nucleotide polymorphisms predict the change in left ventricular mass in response to antihypertensive treatment. *J Hypertens.* 22(12), 2321-2328 (2004).

20. Kurland L, Liljedahl U, Karlsson J, et al.: Angiotensinogen gene polymorphisms: relationship to blood pressure response to antihypertensive treatment. Results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation vs Atenolol (SILVHIA) trial. *Am J Hypertens.* 17(1), 8-13 (2004).

21. Hallberg P, Karlsson J, Lind L, et al.: Gender-specific association between preproendothelin-1 genotype and reduction of systolic blood pressure during antihypertensive treatment--results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA). *Clin Cardiol.* 27(5), 287-290 (2004).

22. Gerloff T: Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 369(1), 69-77 (2004).

23. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin 1-converting enzyme gene accountig for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86, 1343-1346 (1990).

24. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, et al.: Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial Investigators. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med.* 349(20),

1893-1906 (2003).

25. Ohmichi N, Iwai N, Uchida Y et al.: Relationship between the response to the angiotensin converting enzyme inhibitor imidapril and the angiotensin converting enzyme genotype. *Am J Hypertens* 10(8), 951-955 (1997).
26. Stavroulakis GA, Makris TK, Krespi PG et al.: Predicting response to chronic antihypertensive treatment with fosinopril: the role of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. *Cardiovasc Drugs Ther* 14(4), 427-432 (2000).
27. Koopmans RP, Insel PA, Michel MC : Pharmacogenetics of hypertension treatment: a structured review. *Pharmacogenetics* 13(12), 705-713 (2003).
28. Li X, Du Y, Huang X: Correlation of Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with effect of antihypertensive therapy by Angiotensin-converting enzyme inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 8(1), 25-30 (2003).
29. Yu H, Zhang Y, Liu G: Relationship between polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and the response to angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertensive patients. *Hypertens Res.* 26(11), 881-886 (2003).
30. Arnett DK, Davis BR, Ford CE et al.: Pharmacogenetic association of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism on blood pressure and cardiovascular risk in relation to antihypertensive treatment: the Genetics of Hypertension-Associated Treatment (GenHAT) study. *Circulation.* 111, 3374-3383 (2005).
31. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, et al.: Pharmacogenetic interactions between angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 44(10), 2019-2026 (2004).
32. Allabi AC, Gala JL, Horsmans Y, et al.: Functional impact of CYP2C95, CYP2C96, CYP2C98, and CYP2C911 in vivo among black Africans. *Clin Pharmacol Ther.* 76:113-118 (2004).
33. Hallberg P, Karlsson J, Kurland L et al.: The CYP2C9 genotype predicts the blood pressure response to ibesartan: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *J. Hypertens* 20, 2089-2093 (2002).
34. Sekino K, Kubota T, Okada Y, et al.: Effect of the single CYP2C9*3 allele on pharmacokinetics and pharmacodynamics of losartan in healthy Japanese subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 59(8-9):589-592 (2003).
35. Birkenhager WH, de Leeuw PW: Non-peptide angiotensin type 1 receptor antagonists in the treatment of hypertension. *J Hypertens.* 17, 873-881 (1999).
36. Koike H, Sada T, Mizuno M: In vitro and in vivo pharmacology of olmesartan medoxomil, an angiotensin II type AT1 receptor antagonist. *J Hypertens,* S3-14 (2001).

37. Spiering W, Kroon AA, Fuss-Lejeune MJ, de Leeuw PW: Genetic contribution to the acute effects of angiotensin II type 1 receptor blockade. *J Hypertens.* 23(4), 753-758 (2005).
38. Sookoian S, Castano G, Garcia SI, Viudez P, Gonzalez C, Pirola CJ: A1166C Angiotensin II Type 1 Receptor Gene Polymorphism May Predict Hemodynamic Response to Losartan in Patients with Cirrhosis and Portal Hypertension. *Am J Gastroenterol.* 100(3), 636-642 (2005).
39. Stanton A, Jensen C, Nussberger J, O'Brien E: Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral renin inhibitor, aliskiren. *Hypertension* 42(6), 1137-1143 (2003).
40. Stanton A: Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs.* 3(6), 389-394 (2003).
41. Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, Bedigian MP: Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation* 111(8), 1012-1018 (2005). • A well designed study with the last renin-inhibitor Aliskiren.
42. Frazier L, Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinkle E: Multilocus effects of the renin-angiotensin-aldosterone system genes on blood pressure response to a thiazide diuretic. *Pharmacogenomics J.* 2004;4(1), 17-23.
43. Vormfelde SV, Burckhardt G, Zirk A, Wojnowski L, Brockmoller J: Pharmacogenomics of diuretic drugs: data on rare monogenic disorders and on polymorphisms and requirements for further research. *Pharmacogenomics.* 4(6):701-734 (2003).
44. Vormfelde SV, Engelhardt S, Zirk A, et al.: CYP2C9 polymorphisms and the interindividual variability in pharmacokinetics and pharmacodynamics of the loop diuretic drug torsemide. *Clin Pharmacol Ther.* 76(6), 557-566 (2004).
45. Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial Collaborative Research Group. Diuretic versus alpha-blocker as first-step antihypertensive therapy: final results from the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Hypertension* 42(3), 239-246 (2003). • This article shows final results of the ALLHAT pharmacogenetic study.
46. Cusi D, Barlassina C, Azzani T et al.: Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* (1997) 349(9062), 1353-1357.
47. Turner ST, Chapman AB, Schwartz GL, Boerwinkle E: Effects of endothelial nitric oxide synthase, alpha-adducin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide. *Am J Hypertens.* 16(10), 834-839 (2003).
48. Glorioso N, Manunta P, Filigheddu F et al.: the role of α -adducin polymorphism in blood pressure and sodium handling regulation may not be excluded by a negative

association study. *Hypertension* 34, 649-654 (1999).

49. Sciarrone MT, Stella P, Barlassina C et al.: ACE and α -adducin polymorphism as markers of individual response to diuretic therapy. *Hypertension* 41, 398-403 (2003).

50. Bianchi G, Ferrari P, Staessen JA: Adducin polymorphism: detection and impact on hypertension and related disorders. *Hypertension*. 45(3), 331-340 (2005). • This brief review helps to clarify the impact of adducin in hypertension and its related disorders.

51. Yu Y, Niu T, Venners SA, et al.: Associations of baseline blood pressure levels and efficacy of Benazepril treatment with interaction of alpha-adducin and ACE gene polymorphisms in hypertensives. *Clin Exp Hypertens*. 27(1), 83-94 (2005).

52. Baker EH, Duggal A, Dong Y, et al.: Amiloride, a specific drug for hypertension in black people with T594M variant? *Hypertension*. 40(1),13-17 (2002).

53. Cicoira M, Rossi A, Bonapace S et al.: Effects of ACE gene insertion/deletion polymorphism on response to spironolactone in patients with chronic heart failure. *Am J Med* 116(10), 657-661 (2004).

54. Kurland L, Melhus H, Karlsson J et al.: Aldosterone synthase (CYP11B2) -344 C/T polymorphism is related to antihypertensive response: result from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *Am J Hypertens* 15(5), 389-393 (2002).

55. Ortlepp JR, Hanrath P, Mevissen V, Kiel G, Borggrefe M, Hoffmann R: Variants of the CYP11B2 gene predict response to therapy with candesartan. *Eur J Pharmacol*. 445(1-2), 151-152 (2002).

56. Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR: Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics*. 5, 243-272 (2004).

57. Yamaori S, Yamazaki H, Iwano S, et al.: CYP3A5 Contributes significantly to CYP3A-mediated drug oxidations in liver microsomes from Japanese subjects. *Drug Metab Pharmacokinet*. 19, 120-129 (2004).

58. Yamamoto T, Kubota T, Ozeki T, et al.: Effects of the CYP3A5 genetic polymorphism on the pharmacokinetics of diltiazem. *Clin Chim Acta*. 362, 147-154 (2005).

59. Meisel P, Giebel J, Kunert-Keil C, Dazert P, Kroemer HK, Kocher T: MDR1 gene polymorphisms and risk of gingival hyperplasia induced by calcium antagonists. *Clin Pharmacol Ther*. 79(1), 62-71 (2006).

60. Nelson MT, Bonev AD: The B1 subunit of the Ca²⁺ sensitive K⁺ channel protects against hypertension. *J Clin Invest* 113, 955-957 (2004).

61. Fernandez-Fernandez JM, Tomas M, Vazquez E, et al.: Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. *J Clin Invest*. 113, 1032-1039 (2004).

62. Senti M, Fernandez-Fernandez JM, Tomas M, et al.: Protective effect of the KCNMB1 E65K genetic polymorphism against diastolic hypertension in aging women and its relevance to cardiovascular risk. *Circ Res.* 97, 1360-1365 (2005).
63. Jachymova M, Horky K, Bultas J, et al.: Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 284(2), 426-430 (2001).
64. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, et al.: Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 353, 2148-2157 (2005).
65. Sperling H, Eisenhardt A, Virchow S, et al.: Sildenafil response is influenced by the G protein beta 3 subunit GNB3 C825T polymorphism: a pilot study. *J Urol.* 169(3), 1048-1051 (2003).
66. Klette CPR, Anderson Dock, Shollok M, Granger JP: Antisense oligodeoxynucleotides directed against a novel angiotensinogen mRNA-stabilizing protein reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol* 287, 619-626 (2004). • This work revives interest of antisense oligodeoxynucleotides as potential perspective in antihypertensive therapy.
67. Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Gavras H: Effects of antisense oligodeoxynucleotide targeting of the alpha(2B)-adrenergic receptor messenger RNA in the central nervous system. *Hypertension* 38(5), 1075-1080 (2001).
68. Awano S, Dawson LA, Hunter AR, Turner AJ, Usmani BA: Endothelin system in oral squamous carcinoma cells: Specific siRNA targeting of ECE-1 blocks cell proliferation. *Int J Cancer.* 118(7), 1645-1652 (2006).
69. Ueno T, Tremblay J, Kunes J, et al.: Gender-specific genetic determinants of blood pressure and organ weight: pharmacogenetic approach. *Physiol Res.* 52(6), 689-700 (2003).
70. Padmanabhan S, Wallace C, Munroe PB, et al.: Chromosome 2p shows significant linkage to antihypertensive response in the British Genetics of Hypertension Study. *Hypertension.* 47(3), 603-608 (2006). • First study to identify genomewide significant linkage by partitioning different pathways of hypertension based on drug response.
71. Trotta R, Donati MB, Iacoviello L: Trends in pharmacogenomics of drugs acting on hypertension. *Pharmacol Res.* 49(4), 351-356 (2004).
72. Ordovas JM, Mooser V: Metagenomics: the role of the microbiome in cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol.* 17(2):157-161 (2006).
73. Kerb R: Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett.* 234(1), 4-33 (2006).
74. Liu J, Liu ZQ, Tan ZR, et al.: Gly389Arg polymorphism of beta1-adrenergic receptor is associated with the cardiovascular response to metoprolol. *Clin Pharmacol Ther.* 74(4),372-379 (2003).

75. Beitelshes AL, Zineh I, Yarandi HN, Pauly DF, Johnson JA: Influence of phenotype and pharmacokinetics on beta-blocker drug target pharmacogenetics. *Pharmacogenomics J.* 2006 Jan 10;
76. Matayoshi T, Kamide K, Takiuchi S, et al.: The thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter gene, C1784T, and adrenergic receptor-beta3 gene, T727C, may be gene polymorphisms susceptible to the antihypertensive effect of thiazide diuretics. *Hypertens Res.* 27(11), 821-833 (2004).
77. Nürnberger J, Dammer S, Mitchell A, et al.: Effect of C825T polymorphism of the G protein beta3 subunit on the systolic blood pressure lowering effect of clonidine in young, healthy males. *Clin Pharmacol Ther* 74, 53-60 (2003).
78. Maitland-van der Zee AH, Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Klungel OH, Boerwinkle E. A multilocus approach to the antihypertensive pharmacogenetics of hydrochlorothiazide. *Pharmacogenet Genomics.* 15(5), 287-293 (2005).
79. Schelleman H, Stricker BH, Verschuren WM, et al.: Interactions between five candidate genes and antihypertensive drug therapy on blood pressure. *Pharmacogenomics J.* 6(1), 22-26 (2006).
80. Harrap SB, Tzourio C, Cambien F, et al.: PROGRESS Collaborative Group. The ACE gene I/D polymorphism is not associated with the blood pressure and cardiovascular benefits of ACE inhibition. *Hypertension.* 42(3), 297-303 (2003).
81. Voors AA, van Geel PP, Oosterga M, Buikema H, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH: Vascular effects of quinapril completely depend on ACE insertion/deletion polymorphism. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 5(3), 130-134 (2004).
82. Vormfelde SV, Sehrt D, Bolte D, Pahl S, Tzvetkov M, Brockmoller J: Hydrochlorothiazide efficacy and polymorphisms in ACE, ADD1 and GNB3 in healthy, male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 62(3), 195-201 (2006).
83. Bis JC, Smith NL, Psaty BM, et al.: Angiotensinogen Met235Thr polymorphism, angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy, and the risk of nonfatal stroke or myocardial infarction in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 16(12), 1011-1017 (2003).
84. Redon J, Luque-Otero M, Martell N, Chaves FJ; POLPRI Investigators. Renin-angiotensin system gene polymorphisms: relationship with blood pressure and microalbuminuria in telmisartan-treated hypertensive patients. *Pharmacogenomics J.* 5(1), 14-20 (2005).
85. Liljedahl U, Karlsson J, Melhus H, et al.: A microarray minisequencing system for pharmacogenetic profiling of antihypertensive drug response. *Pharmacogenetics.* 13(1):7-17 (2003).
86. Wu SL, Li DQ, Li HF, Yu Q, Li Y, Zhao HY. Association of polymorphism in alpha-adducin gene with antihypertensive effect of Hydrochlorothiazide. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 33(10), 880-884 (2005).

Figure 1. Antihypertensive drugs and their targets

Different antihypertensive drugs classes: diuretics that increase kidney-salt excretion and modify vascular reactivity; beta-blockers, acting on resistive vessels system via the sympathetic nervous system; angiotensin-converting inhibitors that block angiotensin II action; calcium inhibitors, which have a direct vascular vasodilatator effect, alpha-blockers that cause an arterial vasodilatation effect, angiotensin II antagonists, and drugs with central activity. Drugs starred were not investigated in pharmacogenetic studies yet.

β-blockers

Acebutolol
 Atenolol
 Betaxolol
 Bisoprolol
 Carteolol
 Celiprolol
 Esmolol
 Labetalol
 Metoprolol
 Nadolol
 Nebivolol
 Oxprenolol
 Pindolol
 Propanolol
 Teratolol
 Timolol

Diuretics

Loop Diuretics

Bumetamide -
 Furosemide -
 Piretanide - Furosemide -
 Piretanide - Musolimine

K⁺-Sparing Diuretics

Amiloride - Triamterene

Aldosterone antagonists

Canrenone - Eplerenone
 Spironolactone

Thiazide diuretics

Cicletanine -
 Hydrochlorothiazide -
 Indapamide - Xipamide -
 Metolazone -
 Chlorthalidone

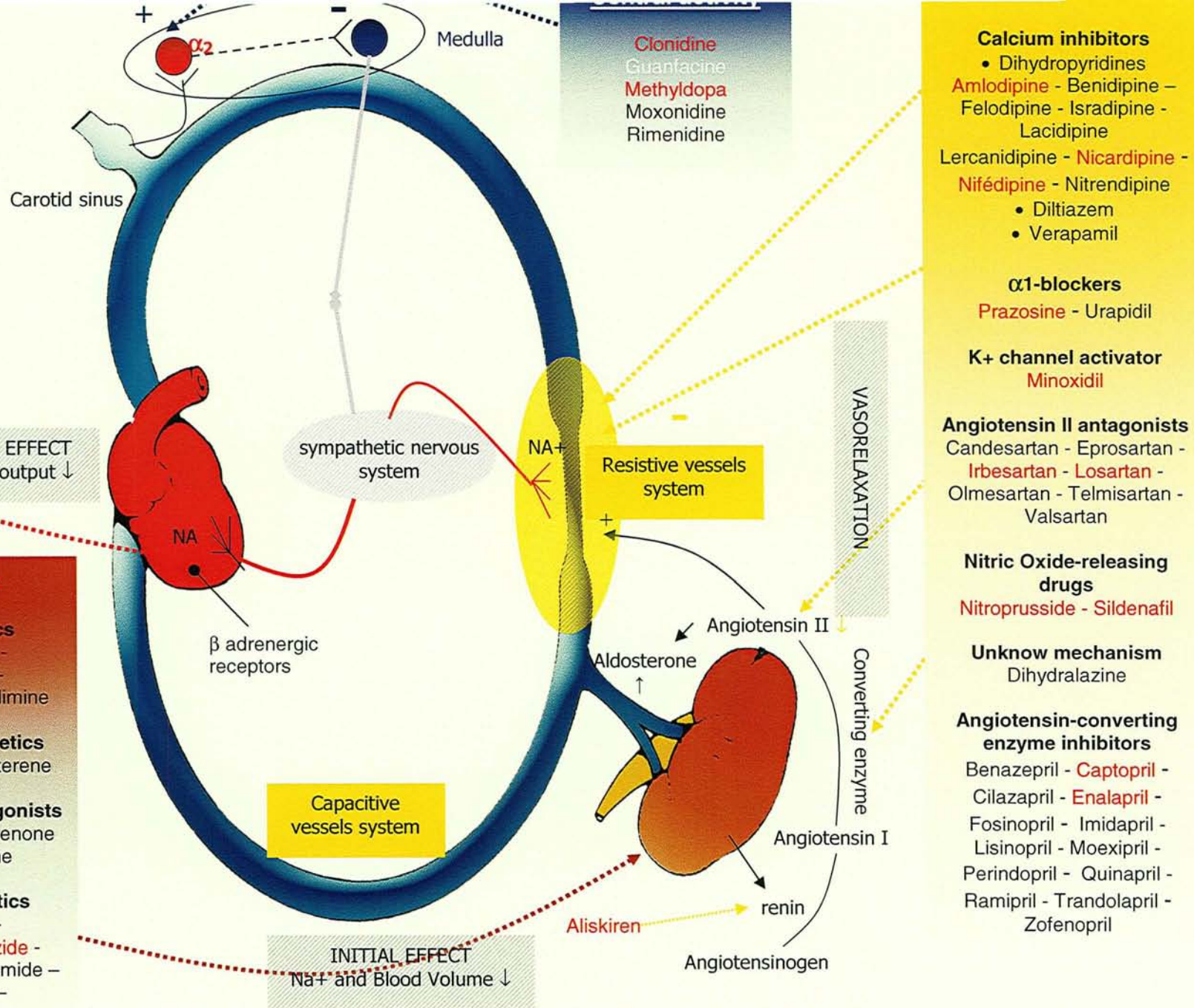
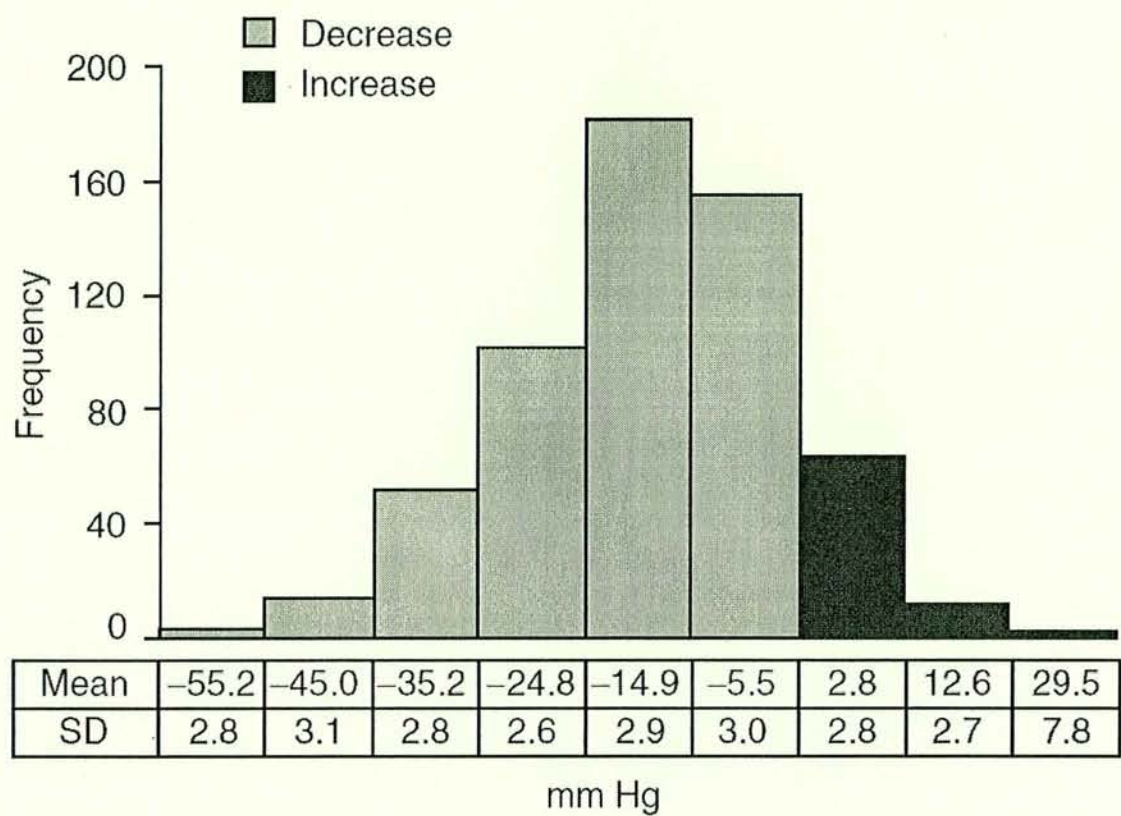


Figure 1. Antihypertensive drugs and their targets

Figure 2. Frequency distribution of systolic blood pressure response to a standard dose of hydrochlorothiazide in a biracial sample of 585 adults with essential hypertension.

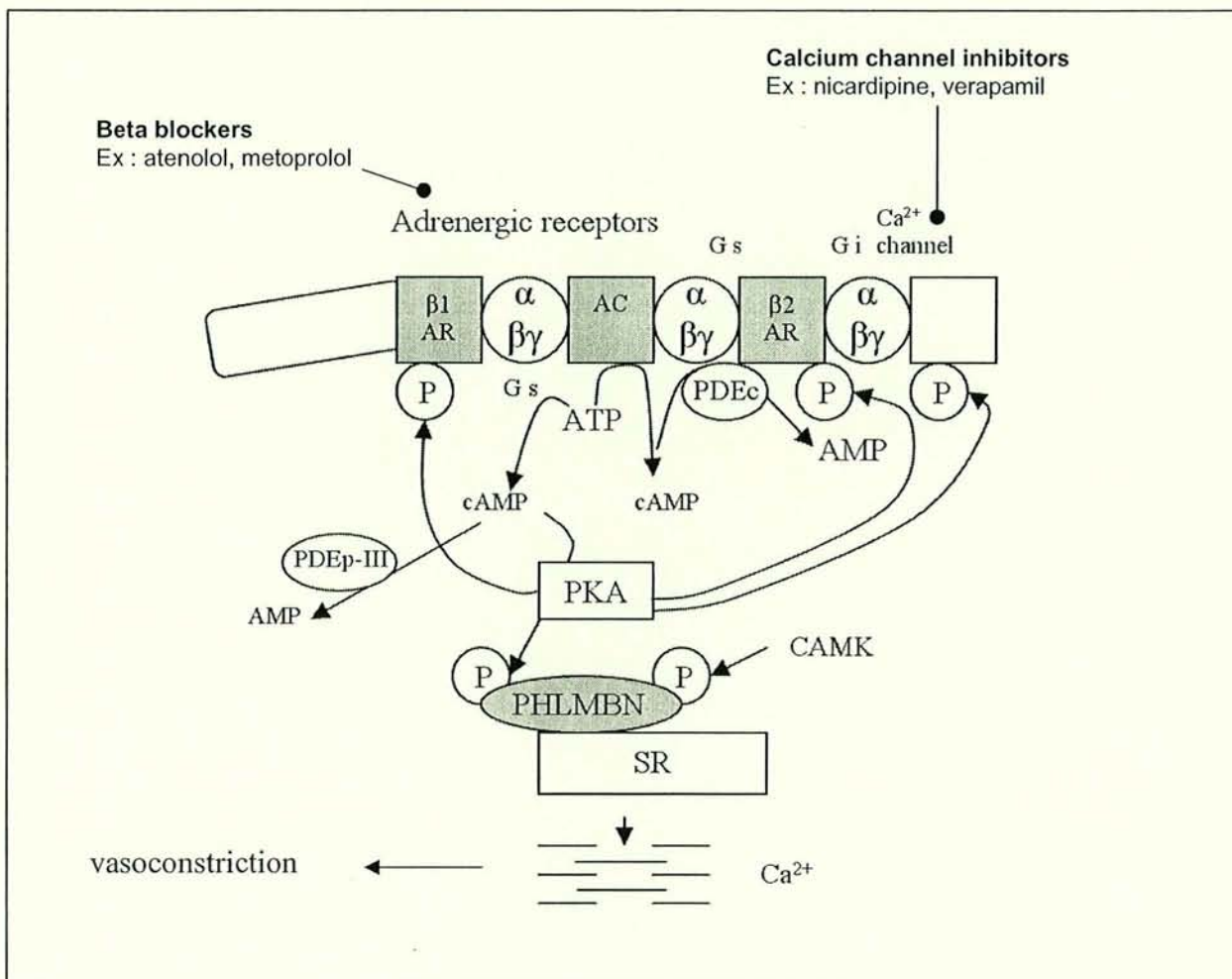


Legend

Overall mean response = 14.7 ± 13.1 mm Hg. SD = standard deviation.

Figure reproduced with permission from Gary L. Schwartz and Stephen T. Turner Am J Pharmacogenomics 2004; 4 (3): 151-160. [1]

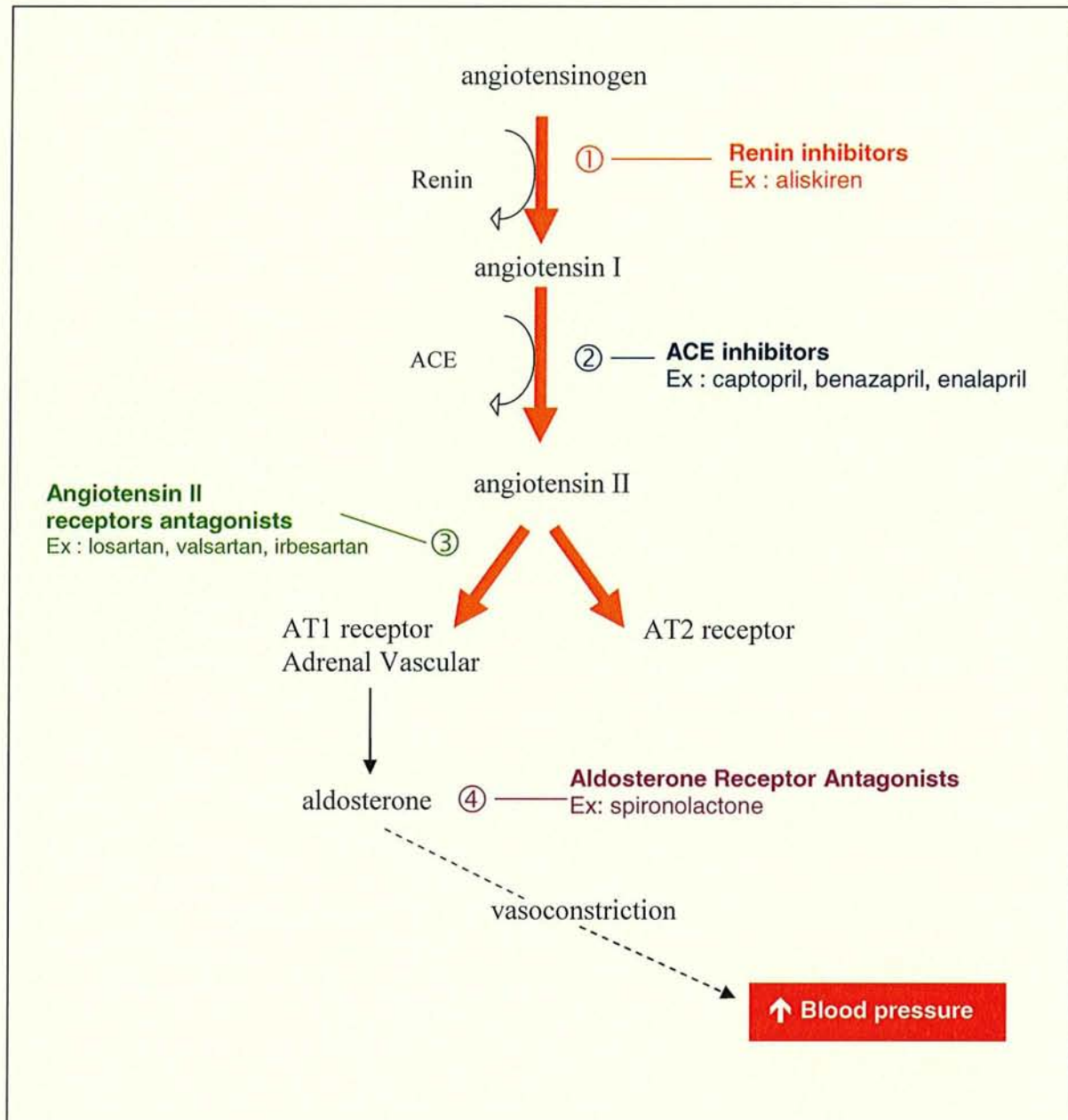
Figure 3. Adrenergic receptors and G proteins and inhibitors



Legend

β_1 AR = β_1 -adrenergic receptor; β_2 AR = β_2 -adrenergic receptor; AC = adenylyl cyclase; G_s = stimulatory G protein with α , β , and γ subunits; G_i = inhibitory G protein with α , β , and γ subunits; ATP = adenosine triphosphate; cAMP = cyclic adenosine monophosphate; PDE_c = cytosolic phosphodiesterases; PDE_p = particulate, SR-associated PDE III; SR = sarcoplasmic reticulum; PHLMBN = phospholamban; PKA = cAMP-dependent protein kinase A; CAMK = calmodulin-activated kinase; AMP = adenosine monophosphate.

Figure 4: Renin Angiotensin Aldosterone system and inhibitors

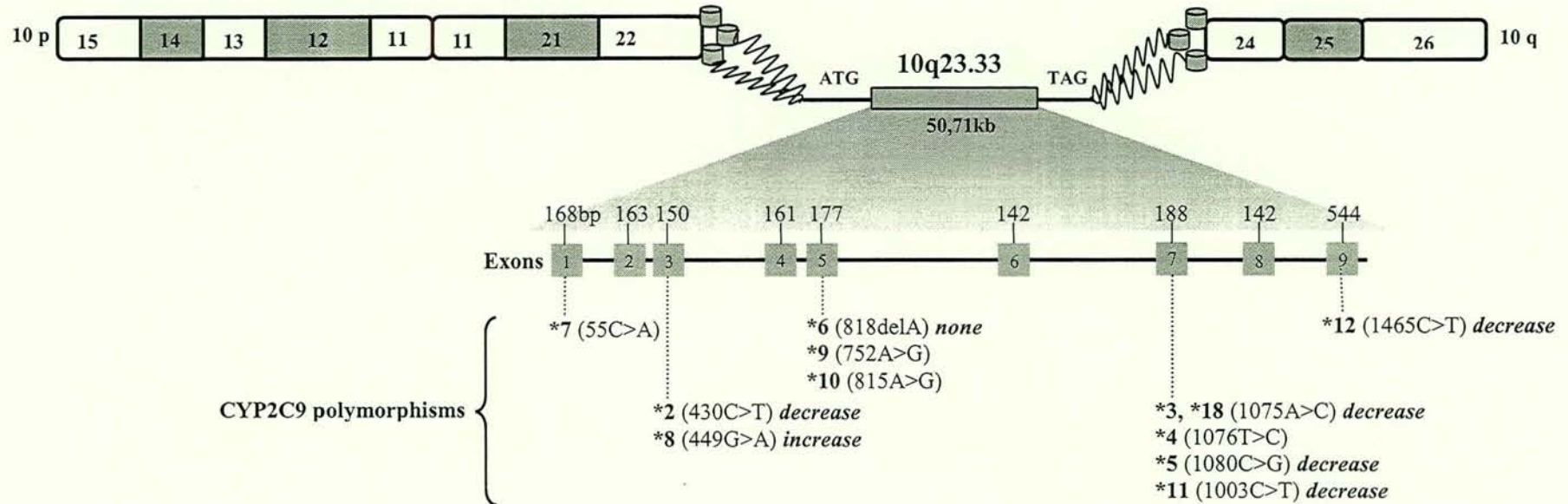


Legend

ACE, angiotensin converting enzyme; AT1 receptor, angiotensin receptor 1; AT2 receptor, angiotensin receptor 2. The RAS may be blocked at various levels. ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists have been shown to be effective in the treatment of hypertension. ACE inhibitors have been proven also effective in the treatment of heart failure and renal insufficiency secondary to diabetes. Renin inhibitors have the potential to be beneficial in the treatment of the same diseases.

Figure 5. Functional consequences of *CYP2C9* gene polymorphisms

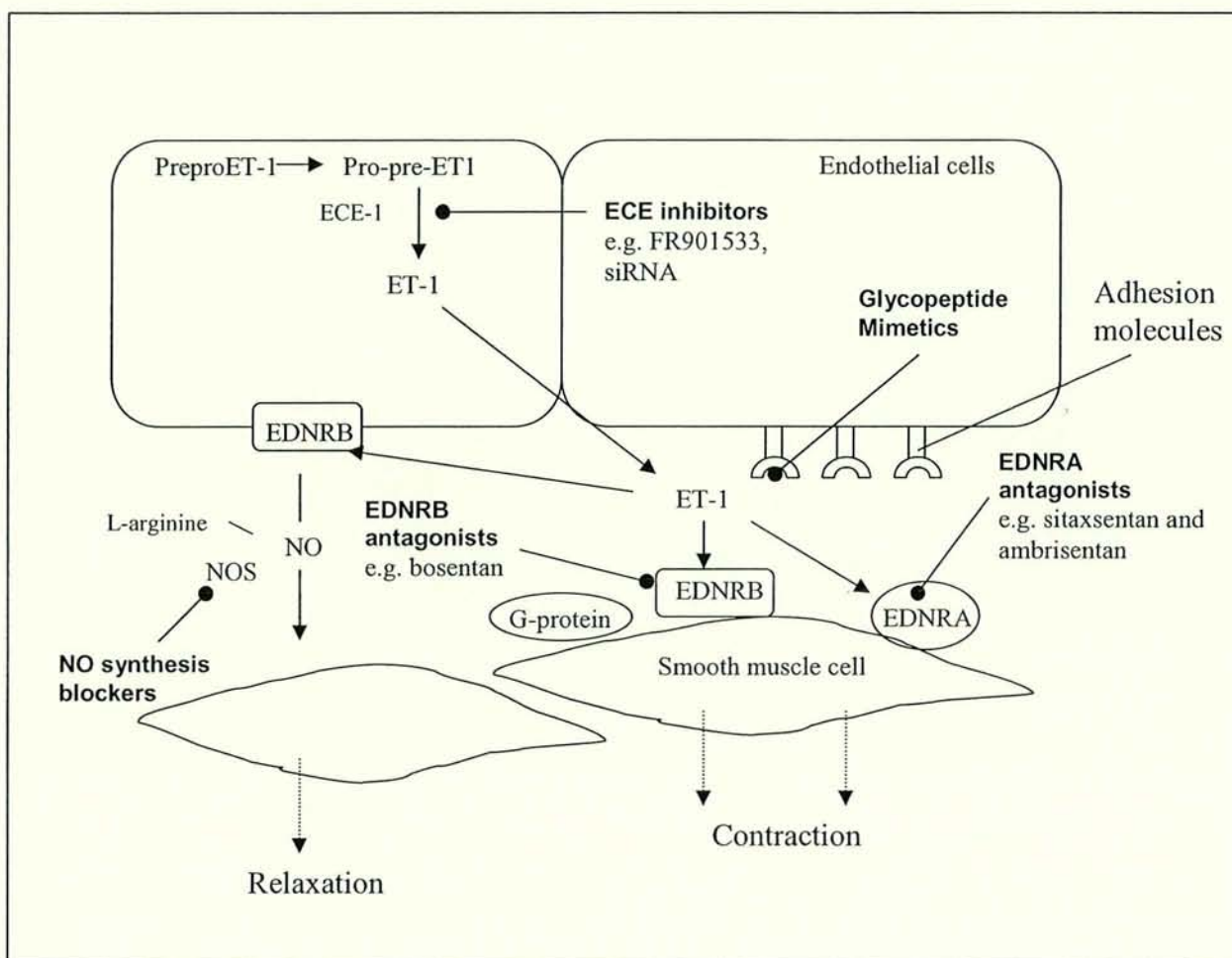
Chromosome 10



Legend

Consequences of polymorphism on CYP2C9 activity are bold italicized

Figure 6. Endothelial system: present and future inhibitors



Legend

cAMP, cyclic adenosine monophosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; ECE inhibitors, endothelin-converting enzyme inhibitors; ET-1, endothelin-1; EDNRA, endothelin receptor A; EDNRB, endothelin receptor type B; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; siRNA, small interference ribonucleic acid.

EDNRA and EDNRB antagonists inhibit effects of endothelin mediated through endothelin A and B receptors, and the vascular-remodeling and constriction effects of endothelin. Endothelin type A receptor blockers could inhibit the vasoconstrictor effect of EDNRA by maintaining the vasodilator effect of endothelin via EDNRB. Glycopeptide mimetics and siRNA will maybe represent drugs of the next decade.

Table 1. Major Phase I enzymes, Phase II enzymes and Transporters implicated in antihypertensive drugs metabolism and transport (adapted from [2•, 22, 43, 73]).

Substrates	Enzymes (CYP450 & phase II)	Transporters
ACE inhibitors		
Captopril	2D6	PEPT
Enalapril	3A	OATP
Angiotensin II receptor antagonists		
Candesartan	2C9	
Irbesartan	2C9	
Losartan	2C9 – 3A	ABCB1
Valsartan	2C9	
β-Blockers		
Acebutolol		ABCB1
Alprenolol	2D6	
Atenolol		ABCB1
Bisoprolol	2D6 – 3A	
Bufuralol	2D6 – 1A2 – 2C19 – 3A	
Bunitrolol		ABCB1
Bupranolol	2D6	
Carvedilol	2C9 – 2D6 – 1A2 – 2E1	ABCB1
Celiprolol	3A	ABCB1
Labetalol	2D6	
Metoprolol	2D6 – 2C19	ABCB1
Pindolol	2D6	
Propranolol	2D6 – 1A2 – 2C19 – 3A	ABCB1, OCT2?
Talinolol		ABCB1
Timolol	2D6	ABCB1
Calcium channel blockers		
Amlodipine	3A	
Bepridil	3A	ABCB1
Diltiazem	3A – 2C9 – 2D6	ABCB1
Felodipine	3A	
Isradipine	3A	
Lercanidipine	3A	
Mibefradil [†]	1A2 – 3A – 2D6	ABCB1
Nevirapine	3A	
Nicardipine	3A – 2C9 – 2D6	ABCB1
Nifedipine	3A – 2C9 – 2D6	ABCB1
Nimodipine	2D6	
Nisoldipine	3A	
Nitrendipine	2D6	ABCB1
Perhexiline [†]	2D6	
Verapamil	1A2 – 2C8 – 3A	ABCB1, OCT1
Loop diuretics	2C9, CA1, CA2	NaDC3, OAT1, OAT3 OAT4
Bumetanide		
Furosemide	UGT1A8	
Torsemide	2C9	
Thiazide diuretics	2C9, 2D6	NaDC3, OAT1, OAT3
Indapamide	2D6 – 2C9 – 3A	
K⁺-sparing diuretics		OCT2, OCTN1, NaDC
Amiloride		OCT2
Triamterene	Sulfotransferase	OCT2 + OAT3 for active metabolite parahydroxytriamterene sulfate

Aldosterone antagonists	3A4	ABCB1
Spironolactone		ABCB1
Diverses		
Tienilic acid [¶]	2C9	
Clonidine	2D6	OCT1
Debrisoquine	2D6 - 2D8P1/P2 – 2D7P2	ABCB1
Guanoxan	2D6	
Prazozin		ABCB1, ABCG2, OCT1
Reserpine		ABCB1

Legend

[¶]Drug withdrawn from the world market;

Table 2. Recent pharmacogenetic studies in hypertension related to the adrenergic system

Gene	Polymorphism	Drug(s)	Main findings - comments	Reference
ADRA1A	Arg347Cys	Irbesartan 150 mg	347Cys carriers (n=116) had greater decrease in DBP to short-term irbesartan treatment	Jiang et al. (2005) [17]
ADRA2B	insertion/deletion polymorphism [Glu 322-325], G-98C, C1182A, C1776A, A36G (Thr12Thr)	Azepexole 80 ng up to 80 µg	No significant predictive genotypic-phenotypic associations.	King et al. (2005) [16]
ADRB1	Arg389Gly	Metoprolol 25,50,75 mg	AA carriers (n=8) showed greater SBP response Administration of the drug every 8 hours	Liu et al. (2003) [74]
		Atenolol 25 mg	AA carriers (n=21) had greater decrease in SBP and resting mean BP than GG before and 3 hours after administration of atenolol	Sofowora et al. (2003) [14]
	Arg389Gly Ser49Gly	Metoprolol 50-200 mg twice daily	AA homozygous (n=18) had a nearly 3-fold greater reduction in daytime DBP. Diplotype was also a significant predictor of response.	Johnson et al. (2003) [13]
		Atenolol 50-100 mg	No difference among genotypes	Karlsson et al. (2004) [15]
		Irbesartan 150-300 mg		Beitelshees et al. (2006) [75]
		Metoprolol	Neither Arg389Gly, nor the Ser49Gly polymorphisms are associated with variable negative chronotropic response to metoprolol in 54 untreated hypertensive patients	
ADRB3	T727C	Thiazide diuretics: indapamide (64.5%), trichlormethiazide (26.3%), mefruside (7.9%), and hydrochlorothiazide (1.3%) (unspecified dose)	C allele carriers have a greater mean blood pressure decrease after thiazide diuretics combination dose (n=74 Japanese hypertensive)	Matayoshi et al. (2004) [76]

ADRBs	ADRB1 Arg389Gly ADRB2 Arg16Gly	Hydrochlorothiazide 25 mg daily for 4 weeks	These polymorphisms investigated in 291 unrelated non-Hispanic African American adults and 294 unrelated non-Hispanic white adults with hypertension made no statistically significant contributions to prediction of BP response.	Turner et al. (2003) [47]
ADRBs G-proteins	ADRB1 Arg389Gly ADRB1 Ser49Gly ADRB2 Arg16Gly ADRB3 Trp64Arg GNAS T131C GNB3 C825T	Atenolol 50 mg	Change in BP was only observed among women from a 270 hypertensive sample (with C825T genotype with a greater reduction among CC homozygotes)	Filigheddu et al. (2004) [18]
G-proteins	GNB3 C825T	Clonidine 1µg/kg	T allele is associated with greater reduction in SBP (n= 15 CC, 10 CT, and 5 TT)	Nürnberg et al. (2003) [77]
	GNB3 C825T	Hydrochlorothiazide 25 mg/day, orally for 4 weeks	No significant relationship between the C825T polymorphism and the decline in diastolic blood pressure (291 African/Americans and non-Hispanic Whites and 195 responders and 195 non-responders)	Maitland-van der Zee (2005) [78]
	GNB3 C825T	Unspecified β-blockers, ACE inhibitors, diuretics	The mean SBP level among diuretic users may be modified by the GNB3 825C/T polymorphism. Untreated CC+CT / TT= 220/63 and treated CC+CT / TT= 63/71	Schelleman et al. (2006) [79]

Legend table 2

ADRA1A, adrenergic, alpha-1A-, receptor; ADRA2B, adrenergic, alpha-2B-, receptor; ADRB1, adrenergic, beta-1-, receptor; ADRB2, adrenergic, beta-2-, receptor; ADRB3, adrenergic, beta-3-, receptor; GNAS, Guanine nucleotide-binding protein G(s), alpha subunit ;GNB3, Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3.

Table 3: Recent pharmacogenetic studies in hypertension related to the renin angiotensin aldosterone system

Gene	Polymorphism	Drug(s)	Main findings - comments	Reference
ACE	I/D	Perindopril 4 mg	No significant difference in blood pressure decrease, cardiac events, long term-	Harrap et al. (2003)
		Indapamide 2 or 2.5 mg	risks of stroke among genotypes determined in 5688 participants	[80]
		Benazepril 10 mg	DD subjects showed greater BP response. 89 patients with essential hypertension and 102 normotensive subjects were included in this study. Administration of benazepril 10 mg, once daily, for 2 months.	Li et al. (2003) [28]
		Hydrochlorothiazide 12.5 – 25 mg	The I allele is associated with greater reduction of mean arterial blood pressure. II n=14; ID n=41; DD n=31	Sciarrone et al. (2003) [49]
		Imidapril 5-10 mg	No significant difference in blood pressure decrease among genotypes	Yu et al. (2003)
		Benazepril 10- 20 mg	determined in 517 hypertensives	[29]
		Quinapril 40 mg	Drug restored the decreased vascular response to angiotensin II in DD-genotype patients No effect of quinalapril was demonstrated in II/ID subjects Quinapril group DD n=8 and ID/II n=35; Placebo group DD n=13 and ID/II n=25	Voors et al. (2004) [81]
		Amlodipine 2.5-10 mg	No difference in 6 months BP change among genotype	Arnett et al. (2005)
		Chlorthalidone 12.5-25 mg	No difference of frequencies for stroke, fatal and non fatal coronary heart disease, combined CHD and combined CVD for any drug between DD and ID/II genotypes. DD n=11505 ID n=18950 II n=7484	[30]
		Doxazosin 2-8 mg		
		Lisonopril 10-40 mg		
		Hydrochlorothiazide 25 mg and 100 mg	ACE insertion allele carriers appeared to be more prone to hypokalaemia than deletion allele carriers. The same trend was observed after 25 mg or 100 mg hydrochlorothiazide	Vormfelde et al. (2006) [82]
AGT	Met235Thr	ACE inhibitors (unspecified)	Protective association between ACE inhibitor use and nonfatal stroke (but not nonfatal MI) risk among individuals with ThrThr genotype. 717 controls,	Bis et al. (2003) [83]

			incident stroke (n = 116) and MI (n = 208)	
	G-6A	Hydrochlorothiazide 25 mg	A allele showed greater SBP response in African-American women treated for 4 weeks (n=130 hypertensive women)	Frazier et al. (2004) [42]
		Telmisartan 80 mg	No difference between AA (n=39), AG (n=68) and GG (n=99) genotypes	Redon et al. (2005) [84]
	Met235Thr / G-6A	Atenolol 50-100 mg	235T and -6A alleles showed significant SBP reduction with atenolol (n=49)	Kurland et al. (2004) [20]
		Irbesartan 150-300 mg		
AGTR1	A1166C	Telmisartan 80 mg	No difference between AA (n=110), AC (n=75) and CC (n=21) genotypes	Redon et al. (2005) [84]
	C573T		No difference between CC (n=47), CT (n=91) and TT (n=68) genotypes	
CYP11B2	T267C	Irbesartan (unspecified dose)	TT genotype predicts SBP reduction (97 hypertensives were enrolled in the study)	Liljedahl et al. (2003) [85]
CYP11B2	Thr399Ile ACC→ATC	Hydrochlorothiazide 25 mg/day for 4 weeks	Subjects with the TT genotype had about 9 times (CT genotype have about 5 times) higher probability of being responders to hydrochlorothiazide compared to subjects with CC genotype. 291 African/Americans and non-Hispanic Whites and 195 responders and 195 non-responders	Maitland-van der Zee (2005) [78]

Legend table 3

ACE, angiotensin converting enzyme; AGT, angiotensinogen; AGTR1, angiotensin II receptor, type 1 ; CYP11B2, aldosterone synthase

Table 4. Recent pharmacogenetic studies in hypertension related to the salt regulation system

Gene	Polymorphism	Drug(s)	Main findings - comments	Reference
ADD1	Gly460Trp	Hydrochlorothiazide 12.5-25 mg	Trp allele is associated with a greater reduction in mean arterial blood pressure (n=87 never-treated individuals with mild essential hypertension)	Sciarrone et al. (2003) [49]
		Hydrochlorothiazide 25 mg	No difference among genotypes 585 unrelated adults who were between 30 and 59.9 years of age and who had essential hypertension after treatment for 4 weeks	Turner et al. (2003) [47]
		Hydrochlorothiazide 25 and 100 mg	Effects of genetic polymorphism were stronger with the higher diuretic dose. ADD1 Trp460 carriers may especially benefit from the calcium-sparing effect of thiazides. Study includes 103 males	Vormfelde et al. (2006) [82]
	G614T	Hydrochlorothiazide 12.5 mg	TT genotype is associated with a greater reduction in DBP and MAP Investigation among 754 hypertensive carriers of the polymorphism	Wu et al. (2005) [86]
ANP	Val7Met	Irbesartan 150 mg/d for 4 weeks	ANP Val7Met polymorphism may be a genetic marker for baseline DBP, plasma irbesartan concentrations, and the antihypertensive efficacy of short-term irbesartan therapy. (n=621 Val/Val + n=135Val/Met+Met/Met Chinese patients with essential hypertension)	Zhang et al. (2005) [87]
HSD11B2	CA repeat microsatellite intron 1 G534A (Glu178Glu) exon 3	Hydrochlorothiazide for 8 weeks	CA repeat length was strongly associated with the BP response to hydrochlorothiazide in 91 Italian patients with essential hypertension	Williams et al. (2005) [88]
SLC12A3	C1784T	Thiazide diuretics: indapamide (64.5%), trichlormethiazide (26.3%), meffruside (7.9%), and hydrochlorothiazide (1.3%) (unspecified dose)	Prediction of BP reduction by thiazides may be possible by evaluating this polymorphism in Japanese hypertensives (n= 76)	Matayoshi et al. (2004) [76]

SCNN1B	Thr594Met	Amiloride 10 mg for 2 weeks	Amiloride was effective in lowering blood pressure in 14 individuals with the T594M polymorphism (black hypertensive individuals)	Baker et al. (2002) [52]
		Amiloride 5 mg and 10 mg	T594M allele does not contribute significantly to BP in 6 blacks heterozygous vs 22 controls and does not predict a significantly superior response to amiloride therapy	Hollier et al. (2006) [89]
SCNN1G	SCNN1G_rs5723 (C/G)	Hydrochlorothiazide 25 mg/day, orally for 4 weeks	GA/GA haplotype carriers had better DBP-response to hydrochlorothiazide than subjects with CT/CT haplotype	Maitland-van der Zee (2005) [78]
	SCNN1G_rs5729 (T/A)		291 African/Americans and non-Hispanic Whites and 195 responders and 195 non-responders. Rare allele frequency rs5723: 0.23 (G); rs5729: 0.23 (A)	
WNK1	rs2107614, rs2277869, rs1159744	Hydrochlorothiazide 25 mg/d, orally for 4 weeks	WNK1 polymorphisms predict interindividual differences in antihypertensive responses to hydrochlorothiazide. Black/White patients with essential hypertension CC, n=284/291; CT, n=68/155; TT, n=74/106	Turner et al. (2005) [90]

Legend table 4

ADD1, adducin 1 (alpha); ANP, atrial natriuretic peptide; HSD11B2, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2; SCNN1B, sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta transepithelial Na⁺ transport; SCNN1G, sodium channel, gamma subunit promoter transepithelial Na⁺ transport, gamma; WNK1, protein kinase lysine-deficient-1

Table 5. Other pharmacogenetic studies in hypertension since 2003

Gene	Polymorphism	Drug(s)	Main findings - comments	Reference
APOB	G10108A	Irbesartan 250 mg for 12 weeks	Polymorphism predicted the change in left ventricular mass during antihypertensive therapy (n = 48)	Liljedahl et al. (2004) [19]
CES1	A-816C	Imidapril 5-10 mg/day for 8 weeks	A(-816)C polymorphism affects the transcriptional activity that this may account for the responsiveness to imidapril in 105 Japanese hypertensives	Geshi et al. (2005) [91]
EDN1	G5665T	Atenolol 50-100 mg Irbesartan 150-300 mg for 12 weeks	SBP reduction is greater in T allele carriers in response to atenolol or irbesartan (102 hypertensives with left ventricular hypertrophy randomized to drug)	Hallberg et al. (2004) [21]
EDNRB	G40A	Irbesartan (unspecified dose) or atenolol (unspecified dose) for 3 months	In atenolol treatment group, polymorphism was predictor of SBP and DBP reduction (n=97 hypertensive patients)	Liljedahl et al. (2003) [85]
ENOS	G498A		SBP reduction is greater in AA genotypes in response to atenolol	
LIPC	A110G		GG hypertensive patients have a greater DBP reduction in response to atenolol	
LPL	Ser447Stop	Hydrochlorothiazide 25 mg for 4 weeks	No differences among genotypes (Unrelated hypertensive individuals: African/American (n= 258CC+31CG+1GG) and White (n= 238CC+52CG+1GG)	Turner et al. (2003) [47]
MTHFR	C677T	Benazepril 10 mg/d for 15 days	MTHFR C667T polymorphism modulated baseline DBP and DBP responsiveness by short-term treatment of benazepril in Chinese essential hypertensive patients (n=108 CC, n=230 CT, n=106 TT)	Jiang et al. (2004) [92]
MTR	D919G	Benazepril 10 mg/d for 15 days	The 919G allele was associated with a significantly less diastolic blood pressure reduction in response to benazepril (n= 726 Chinese hypertensive patients)	Zhang et al. (2004) [93]
NOS	Glu298Asp	Hydrochlorothiazide 25 mg/day, orally for 4 weeks	GG genotype are better DBP responders than GT genotype. 291 African/Americans and non-Hispanic Whites and 195 responders and 195 non-responders	Maitland-van der Zee et al. (2005) [78]
NOS		Hydrochlorothiazide 25 mg/d for 4 weeks	DBP ↓ about 9 mm Hg in Asp298 homozygotes vs. 7 mm Hg in the combined group of Glu/Glu 298 homozygotes + Glu298/Asp298 heterozygotes; n=579 hypertensive White and African/Americans	Turner et al. (2003) [47]

Legend table 5

APOB, apolipoprotein B; CES1, carboxylesterase 1; EDNRB, endothelin type B receptor; EDN1, endothelin-1; ENOS, endothelial nitric oxide synthase; LIPC, hepatic lipase; LPL, lipoprotein lipase; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; MTR, 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase; NOS, nitric oxide synthase.

Références Bibliographiques

- Abernathy JR, Thorn MD, Ekelund LG, Holme I, Stinnett SS, Shestov DB, Deev AD.
Correlates of systolic and diastolic blood pressure in men 40 to 59 years of age sampled from United States of America and Union of Soviet Socialist Republics Lipid Research Clinics populations.
Am J Cardiol 1988; 61: 1071-5.
- Adeagbo AS.
Endothelium-derived hyperpolarizing factor: characterization as a cytochrome P450 1A-linked metabolite of arachidonic acid in perfused rat mesenteric prearteriolar bed.
Am J Hypertens 1997; 10: 763-71.
- Aktas D, Guney I, Alikasifoglu M, Yuce K, Tuncbilek E, Ayhan A.
CYP1A1 gene polymorphism and risk of epithelial ovarian neoplasm.
Gynecol Oncol 2002; 86: 124-8.
- Alexandrov K, Cascorbi I, Rojas M, Bouvier G, Kriek E, Bartsch H.
CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation.
Carcinogenesis 2002; 23: 1969-77.
- Annas A, Brittebo E, Hellman B.
Evaluation of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis.
Mutat Res. 2000; 471: 145-55.
- Anonyme.
Tabac- Comprendre la dépendance pour agir.
Expertise collective INSERM.
- Araujo MA, Goulart LR, Cordeiro ER, Gatti RR, Menezes BS, Lourenco C, Silva HD.
Genotypic interactions of renin-angiotensin system genes in myocardial infarction.
Int J Cardiol 2005; 103: 27-32.
- Arias-Vasquez A, Sayed-Tabatabaei FA, Schut AF, Hofman A, Bertolli-Avella AM, Vergeer JM, Aulchenko YS, Witteman JC, van Duijn CM.
Angiotensin converting enzyme gene, smoking and mortality in a population-based study.
Eur J Clin Invest 2005; 35: 444-9.
- Arinami T, Ishiguro H, Onaivi ES.
Polymorphisms in genes involved in neurotransmission in relation to smoking.
Eur J Pharmacol 2000; 410: 215-226.
- Ariyoshi N, Sekine H, Nakayama K, Saito K, Miyamoto A, Kamataki T.
Identification of deletion-junction site of CYP2A6*4B allele lacking entire coding region of CYP2A6 in Japanese.
Pharmacogenetics 2004; 14: 701-5.
- Ariyoshi N, Miyamoto M, Umetsu Y, Kunitoh H, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Nemoto N, Sato K, Kamataki T.
Genetic polymorphism of CYP2A6 gene and tobacco-induced lung cancer risk in male smokers.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002; 11: 890-4.
- Ariyoshi N, Sawamura Y, kamataki T.
A novel single nucleotide polymorphism altering stability and activity of CYP2a6.
Biochem Biophys Res Commun 2001; 281: 810-4.
- Ariyoshi N, Takahashi Y, Miyamoto M, Umetsu Y, Daigo S, Tateishi T, Kobayashi S, Mizorogi Y, Lorient MA, Stucker I, Beaune P, Kinoshita M, Kamataki T.
Structural characterization of a new variant of the CYP2A6 gene (CYP2A6*1B) apparently diagnosed as heterozygotes of CYP2A6*1A and CYP2A6*4C.
Pharmacogenetics 2000; 10: 687-93.
- Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, Inazawa J, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y.
Structure and expression of the Ah receptor repressor gene.
J Biol Chem 2001; 276: 33101-10.
- Bartholomew HC, Knuiman MW.
Longitudinal analysis of the effect of smoking cessation on cardiovascular risk factors in a community sample: the Busselton Study.
J Cardiovasc Risk 1998; 5: 263-71.

Batra V, Patkar AA, Berrettini WH, Weinstein SP, Leone FT.
The genetic determinants of smoking.
Chest 2003; 123: 1730-9.

Berny C, Boyer JC, Capolaghi B, L'Homme GD, Desch G, Garelik D, Hayder R, Houdret N, Jacob N, Koskas T, Laine G, Moel GL, Moulsmas M, Plantin-Carrenard E, Venembre P.
Biomarqueurs de l'exposition à la fumée de cigarette.
Ann Biol Clin (Paris) 2002; 60: 263-72.

Benowitz NL, Pomerleau OF, Pomerleau CS, Jacob P 3rd.
Nicotine metabolite ratio as a predictor of cigarette consumption.
Nicotine Tob Res 2003; 5: 621-4.

Benowitz NL, Perez-Stable EJ, Herrera B, Jacob P 3rd.
Slower metabolism and reduced intake of nicotine from cigarette smoking in Chinese-Americans.
J Natl Cancer Inst 2002; 94: 108-15.

Benowitz NL, Jacob P 3rd, Fong I, Gupta S.
Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine.
J Pharmacol Exp Ther 1994; 268: 296-303.

Benowitz NL.
Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction.
N Engl J Med 1988; 319: 1318-30.

Ben-Shlomo Y, Smith GD, Shipley MJ, Marmot MG.
What determines mortality risk in male former cigarette smokers?
Am J Public Health 1994; 84: 1235-42.

Benwell ME, Balfour DJ, Anderson JM.
Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[3H]nicotine binding sites in human brain.
J Neurochem 1988; 50: 1243-7.

Beuten J, Ma JZ, Payne TJ, Dupont RT, Crews KM, Somes G, Williams NJ, Elston RC, Li MD.
Single- and multilocus allelic variants within the GABA(B) receptor subunit 2 (GABAB2) gene are significantly associated with nicotine dependence.
Am J Hum Genet 2005; 76: 859-64.

Bolz SS, Fisslthaler B, Pieperhoff S, De Wit C, Fleming I, Busse R, Pohl U.
Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated Ca(2+) changes and dilation in isolated resistance arteries.
FASEB J 2000; 14: 255-60.

Boustead C, Taber H, Idle JR, Cholerton S.
CYP2D6 genotype and smoking behaviour in cigarette smokers.
Pharmacogenetics 1997; 7: 411-4.

Burns DM.
Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease.
Prog Cardiovasc Dis 2003; 46: 11-29.

Caporaso NF, Lerman C, Audrain J, Boyd NR, Main D, Issaq HJ, Utermahlan B, Falk RT and Shields P.
Nicotine metabolism and CYP2D6 phenotype in smokers.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; 10: 261-263.

Carroll MA, Balazy M, Margiotta P, Huang DD, Falck JR, McGiff JC.
Cytochrome P-450-dependent HETEs: profile of biological activity and stimulation by vasoactive peptides.
Am J Physiol 1996; 271: R863-9.

Carter B, Long T, Cinciripini P.
A meta-analytic review of the CYP2A6 genotype and smoking behavior.
Nicotine Tob Res 2004; 6: 221-7.

Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I.
A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility.
Cancer Res 1996; 56: 4965-9.

- Castane A, Berrendero F, Maldonado R.
The role of the cannabinoid system in nicotine addiction.
Pharmacol Biochem Behav 2005; 81: 381-6.
- Cauchi S, Stucker I, Solas C, Laurent-Puig P, Cenee S, Hemon D, Jacquet M, Kremers P, Beaune P, Massaad-Massade L.
Polymorphisms of human aryl hydrocarbon receptor (AhR) gene in a French population: relationship with CYP1A1 inducibility and lung cancer.
Carcinogenesis 2001; 22: 1819-24.
- Celander M, Weisbrod R, Stegeman JJ.
Glucocorticoid potentiation of cytochrome P4501A1 induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in porcine and human endothelial cells in culture.
Biochem Biophys Res Commun 1997; 232: 749-53.
- Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A.
Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products.
Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 13915-20.
- Chen GF, Tang YM, Green B, Lin DX, Guengerich FP, Daly AK, Caporaso NE, Kadlubar FF.
Low frequency of CYP2A6 gene polymorphism as revealed by a one-step polymerase chain reaction method.
Pharmacogenetics 1999; 9: 327-32.
- Chevalier D, Allorge D, Lo-Guidice JM, Cauffiez C, Lhermitte M, Lafitte JJ, Broly F.
Detection of known and two novel (M331I and R464S) missense mutations in the human CYP1A1 gene in a French Caucasian population.
Hum Mutat 2001; 17: 355.
- Christian K, Lang M, Maurel P, Raffalli-Mathieu F.
Interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 with cytochrome P450 2A6 mRNA: implications for post-transcriptional regulation of the CYP2A6 gene.
Mol Pharmacol 2004; 65: 1405-14.
- Christopherson KS, Bredt DS.
Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease.
J Clin Invest 1997; 100: 2424-9.
- Cohen C, Kudas E, Griebel G.
CB1 receptor antagonists for the treatment of nicotine addiction.
Pharmacol Biochem Behav 2005; 81: 387-95.
- Cohen C, Bergis OE, Galli F, Lochead AW, Jegham S, Biton B, Leonardon J, Avenet P, Sgard F, Besnard F, Graham D, Coste A, Oblin A, Curet O, Voltz C, Gardes A, Caille D, Perrault G, George P, Soubrie P, Scatton B.
SSR591813, a novel selective and partial alpha4beta2 nicotinic receptor agonist with potential as an aid to smoking cessation.
J Pharmacol Exp Ther 2003; 306: 407-20.
- Cohen SB.
Tobacco addiction as a psychiatric disease.
South Med J 1988; 8: 1083-8.
- Cok I, Aygun Kocabas N, Cholerton S, Karakaya AE, Sardas S.
Determination of coumarin metabolism in Turkish population.
Hum Exp Toxicol 2001; 20: 179-84.
- Comings DE, Gade R, Wu S, Chiu C, Dietz G, Muhleman D, Saucier G, Ferry L, Rosenthal RJ, Lesieur HR, Rugle LJ, Macmurray P.
Studies of the potential role of the dopamine D1 receptor gene in addictive behaviors
Mol Psychiatry 1997; 2: 44-56.
- Corchero J, Pimprale S, Kimura S, Gonzalez FJ.
Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation.
Pharmacogenetics 2001; 11: 1-6.
- Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P, Garte SJ.
Functional significance of different human CYP1A1 genotypes.
Carcinogenesis 1994; 15: 2961-3.

- Cullen P.
Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor.
Am J Cardiol 2000; 86: 943-9.
- Czernin J, Waldherr C.
Cigarette smoking and coronary blood flow.
Prog Cardiovasc Dis 2003; 45: 395-404.
- Dahly-Vernon AJ, Sharma M, McCarthy ET, Savin VJ, Ledbetter SR, Roman RJ.
Transforming growth factor-beta, 20-HETE interaction, and glomerular injury in Dahl salt-sensitive rats.
Hypertension 2005; 45: 643-8.
- Daigo S, Takahashi Y, Fujieda M, Ariyoshi N, Yamazaki H, Koizumi W, Tanabe S, Saigenji K, Nagayama S, Ikeda K, Nishioka Y, Kamataki T.
A novel mutant allele of the CYP2A6 gene (CYP2A6*11) found in a cancer patient who showed poor metabolic phenotype towards tegafur.
Pharmacogenetics 2002; 12: 299-306.
- Dalton TP, Kerzee JK, Wang B, Miller M, Dieter MZ, Lorenz JN, Shertzer HG, Nerbert DW, Puga A.
Dioxin exposure is an environmental risk factor for ischemic heart disease.
Cardiovasc Toxicol 2001; 1: 285-98.
- David SP, Johnstone E, Griffiths SE, Murphy M, Yudkin P, Mant D, Walton R.
No association between functional catechol O-methyl transferase 1947A>G polymorphism and smoking initiation, persistent smoking or smoking cessation.
Pharmacogenetics 2002; 12: 265-8.
- D'Errico A, Malats N, Vineis P, Boffetta P.
Review of studies of selected metabolic polymorphisms and cancer.
IARC Sci Publ 1999; 148: 323-93.
- Denison MS, Nagy SR.
Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 2003;43:309-34.
- DiFranza JR, Savageau JA, Fletcher K, Ockene JK, Rigotti NA, McNeill AD, Coleman M, Wood C. Recollections and repercussions of the first inhaled cigarette.
Addict Behav 2004; 29: 261-72.
- Ding S, Lake BG, Friedberg T, Wolf CR.
Expression and alternative splicing of the cytochrome P-450 CYP2A7.
Biochem J 1995; 306: 161-6.
- Dobson AJ, Alexander HM, Heller RF, Lloyd DM.
How soon after quitting smoking does risk of heart attack decline?
J Clin Epidemiol 1991; 44: 1247-53.
- Doney AS, Lec S, Leese GP, Morris AD, Palmer CN.
Increased cardiovascular morbidity and mortality in type 2 diabetes is associated with the glutathione S transferase theta-null genotype: a Go-DARTS study.
Circulation 2005; 111: 2927-34.
- Draper AJ, Madan A, Parkinson A..
Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes.
Arch Biochem Biophys 1997; 341: 47-61.
- Ducimetiere P, Richard J, Eschwege E, Claude J, Rosselin G.
Les cardiopathies ischémiques: incidence et facteurs de risque: l'étude prospective parisienne.
Journ Annu Diabetol Hotel Dieu 1982; 257-64.
- Edwards RJ, Adams DA, Watts PS, Davies DS, Boobis AR.
Development of a comprehensive panel of antibodies against the major xenobiotic metabolising forms of cytochrome P450 in humans.
Biochem Pharmacol 1998; 56: 377-87.

- Endler G, Mannhalter C.
Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis.
Clin Chim Acta 2003; 330: 31-55.
- Ezzati M, Lopez AD.
Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000.
Lancet 2003; 362: 847-52.
- Falck JR, Lumin S, Blair I, Dishman E, Martin MV, Waxman DJ, Guengerich FP, Capdevila JH.
Cytochrome P-450-dependent oxidation of arachidonic acid to 16-, 17-, and 18-hydroxyeicosatetraenoic acids.
J Biol Chem 1990; 265: 10244-9.
- Fallone F, Villard PH, Decome L, Seree E, Meo M, Chacon C, Durand A, Barra Y, Lacarelle B.
PPARalpha activation potentiates AhR-induced CYP1A1 expression.
Toxicology 2005; 216: 122-8.
- Farin FM, Pohlman TH, Omiecinski CJ.
Expression of cytochrome P450s and microsomal epoxide hydrolase in primary cultures of human umbilical vein endothelial cells.
Toxicol Appl Pharmacol 1994; 124: 1-9.
- Fernandez-Salguero P, Hoffman SM, Cholerton S, Mohrenweiser H, Raunio H, Rautio A, Pelkonen O, Huang JD, Evans WE, Idle JR, *et al.*
A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles.
Am J Hum Genet 1995; 57: 651-60.
- Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ.
Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis.
Atherosclerosis 1997; 135: 145-59.
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P.
The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis.
J Clin Invest 1998; 102: 1369-76.
- Fisslthaler B, Fleming I, Busse R.
EDHF: a cytochrome P450 metabolite in coronary arteries.
Semin Perinatol 2000; 24: 15-9.
- Fontana RJ, Lown KS, Paine MF, Fortlage L, Santella RM, Felton JS, Knize MG, Greenberg A, Watkins PB.
Effects of a char-grilled meat diet on expression of CYP3A, CYP1A, and P-glycoprotein levels in healthy volunteers.
Gastroenterology 1999; 117: 89-98.
- Fujieda M, Yamazaki H, Saito T, Kiyotani K, Gyamfi MA, Sakurai M, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Kunitoh H, Kamataki T.
Evaluation of CYP2A6 genetic polymorphisms as determinants of smoking behavior and tobacco-related lung cancer risk in male Japanese smokers.
Carcinogenesis 2004; 25: 2451-8.
- Fukami T, Nakajima M, Higashi E, Yamanaka H, Sakai H, McLeod HL, Yokoi T. (a)
Characterization of novel CYP2A6 polymorphic alleles (CYP2A6*18 and CYP2A6*19) that affect enzymatic activity.
Drug Metab Dispos 2005; 33: 1202-10 (a).
- Fukami T, Nakajima M, Higashi E, Yamanaka H, McLeod HL, Yokoi T.
A novel CYP2A6*20 allele found in African-American population produces a truncated protein lacking enzymatic activity.
Biochem Pharmacol 2005; 70: 801-8 (b).
- Fukami T, Nakajima M, Yoshida R, Tsuchiya Y, Fujiki Y, Katoh M, McLeod HL, Yokoi T.
A novel polymorphism of human CYP2A6 gene CYP2A6*17 has an amino acid substitution (V365M) that decreases enzymatic activity in vitro and in vivo.
Clin Pharmacol Ther 2004; 76: 519-27.
- Gabel S, Stadler J, Bjorn J, Shindlerdecker R.
Homovanillic acid and dopamine-beta-hydroxylase in male youth: relationships with paternal substance abuse and antisocial behavior.
Am J Drug Alcohol Abuse 1995; 21: 363-78.

- Gabriel AS, Ahnve S, Wretling B, Martinsson A.
IL-6 and IL-1 receptor antagonist in stable angina pectoris and relation of IL-6 to clinical findings in acute myocardial infarction.
J Intern Med 2000; 248: 61-6.
- Gadzicki D, Muller-Vahl KR, Heller D, Ossege S, Nothen MM, Hebebrand J, Stuhmann M.
Tourette syndrome is not caused by mutations in the central cannabinoid receptor (CNR1) gene.
Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2004; 127: 97-103.
- Gainer JV, Bellamine A, Dawson EP, Womble KE, Grant SW, Wang Y, *et al.*
Functional variant of CYP4A11 20-hydroxyecosatetraenoic acid synthase is associated with essential hypertension.
Circulation 2005; 111: 63-69.
- Gambier N, Batt AM, Marie B, Pfister M, Siest G, Visvikis-Siest S.
Association of CYP2A6*1B genetic variant with the amount of smoking in French adults from the Stanislas cohort.
Pharmacogenomics J 2005; 5: 271-5.
- Gannon M, Gilday D, Rifkind AB.
TCDD induces CYP1A4 and CYP1A5 in chick liver and kidney and only CYP1A4, an enzyme lacking arachidonic acid epoxidase activity, in myocardium and vascular endothelium.
Toxicol Appl Pharmacol 2000; 164: 24-37.
- Garcia-Closas M, Kelsey KT, Wiencke JK, Xu X, Wain JC, Christiani DC.
A case-control study of cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferase M1, cigarette smoking and lung cancer susceptibility (Massachusetts, United States).
Cancer Causes Control 1997; 8: 544-53.
- Garte S, Ganguly S, Taioli E.
Effect of genotype on steady-state CYP1A1 gene expression in human peripheral lymphocytes.
Biochem Pharmacol 2003; 65: 441-5.
- Garte S.
The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1.
Carcinogenesis 1998; 19: 1329-32.
- Genatlas
<http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas>, 15/10/2005
- Georgiadis P, Topinka J, Vlachodimitropoulos D, Stoikidou M, Gioka M, Stephanou G, Autrup H, Demopoulos NA, Katsouyanni K, Sram R, Kyrtopoulos SA.
Interactions between CYP1A1 polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations.
Carcinogenesis 2005; 26: 93-101.
- Germer S, Holland MJ, Higuchi R.
High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR.
Genome Res 2000; 10: 258-266.
- Gerra G, Garofano L, Zaimovic A, Moi G, Branchi B, Bussandri M, Brambilla F, Donnini C.
Association of the serotonin transporter promoter polymorphism with smoking behavior among adolescents.
Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005; 135: 73-8.
- Godtfredsen NS, Prescott E, Osler M.
Effect of smoking reduction on lung cancer risk.
JAMA 2005; 294: 1505-10.
- Gotti C, Clementi F.
Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology.
Prog Neurobiol. 2004; 74: 363-96.
- Gu DF, Hinks LJ, Morton NE, Day IN.
The use of long PCR to confirm three common alleles at the CYP2A6 locus and the relationship between genotype and smoking habit.
Ann Hum Genet 2000; 64: 383-90.

- Guengerich FP.
Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy.
Cancer Res 1988; 48: 2946-54.
- Habdous M, Siest G, Herbeth B, Vincent-Viry M, Visvikis S. Related Articles, Links
Polymorphismes génétiques de la Glutathione S-transferases genetic polymorphisms et pathologies humaines: revue des études épidémiologiques.
Ann Biol Clin 2004; 62: 15-24.
- Habdous M, Vincent-Viry M, Visvikis S, Siest G.
Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity.
Clin Chim Acta 2002; 326: 131-42.
- Haberl M, Anwald B, Klein K, Weil R, Fuss C, Gepdiremen A, Zanger UM, Meyer UA, Wojnowski L.
Three haplotypes associated with CYP2A6 phenotypes in Caucasians.
Pharmacogenet Genomics 2005; 15: 609-24.
- Haddy N, De Bacquer D, Chemaly MM, Maurice M, Ehnholm C, Evans A, Sans S, Do Carmo Martins M, De Backer G, Siest G, Visvikis S.
The importance of plasma apolipoprotein E concentration in addition to its common polymorphism on inter-individual variation in lipid levels: results from Apo Europe.
Eur J Hum Genet 2002; 10: 841-50.
- Hadidi H, Zahlse K, Idle JR, Cholerton S.
A single amino acid substitution (Leu160His) in cytochrome P450 CYP2A6 causes switching from 7-hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarin.
Food Chem Toxicol 1997; 35: 903-7.
- Hahn ME, Karchner SI, Franks DG, Merson RR.
Aryl hydrocarbon receptor polymorphisms and dioxin resistance in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*).
Pharmacogenetics 2004; 14: 131-43.
- Handa K, Tanaka H, Shindo M, Kono S, Sasaki J, Arakawa K.
Relationship of cigarette smoking to blood pressure and serum lipids.
Atherosclerosis 1990; 84: 189-93.
- Hankinson O.
Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor.
Arch Biochem Biophys 2005; 433: 379-86.
- Harper PA, Wong JY, Lam MS, Okey AB.
Polymorphisms in the human AH receptor.
Chem Biol Interact 2002; 141: 161-87.
- Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, Fitzgerald T, Dubin W.
Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke.
Chest 1999; 115: 829-35.
- Hasler JA.
Pharmacogenetics of cytochromes P450.
Mol Aspects Med 1999; 20: 12-24, 25-137.
- Hayashi SI, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K.
PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene.
Nucleic Acids Res 1991; 19: 4797.
- Hayes JD, Pulford DJ.
The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.
Crit Rev Biochem Mol Biol 1995; 30: 445-600.
- Hecht SS.
Tobacco smoke carcinogens and lung cancer.
J Natl Cancer Inst 1999; 91: 1194-210.

- Heidbreder A, Hagan J.
Novel pharmacotherapeutic approaches for the treatment of drug addiction and craving.
Current Opinion in Pharmacology 2005; 5: 107-118.
- Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP.
Allelic variation of human serotonin transporter gene expression.
J Neurochem 1996; 66: 2621-4.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T.
Interleukin-6 and the acute phase response.
Biochem J 1990; 265: 621-36.
- Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Munzel T, Just H, Olschewski M, Drexler H.
Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL.
Circulation. 1996; 93: 1346-53.
- Henningfield JE, Burns DM, Dybing E.
Guidance for research and testing to reduce tobacco toxicant exposure.
Nicotine Tob Res 2005; 7: 821-6.
- Hermann C, Zeiher AM, Dimmeler S.
Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 3588-92.
- Hioki H, Aoki N, Kawano K, Homori M, Hasumura Y, Yasumura T, Maki A, Yoshino H, Yanagisawa A, Ishikawa K.
Acute effects of cigarette smoking on platelet-dependent thrombin generation.
Eur Heart J 2001; 22: 56-61.
- Hiratsuka M, Hinai Y, Konno Y, Nozawa H, Konno S, Mizugaki M.
Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2B6 gene in Japanese individuals.
Drug Metab Pharmacokinet 2004; 19: 155-8.
- Hiroi T, Imaoka S, Funae Y.
Dopamine formation from tyramine by CYP2D6.
Biochem Biophys Res Commun 1998; 249: 838-43.
- Hodges VM, Molloy GY, Wickramasinghe SN.
Demonstration of mRNA for five species of cytochrome P450 in human bone marrow, bone marrow-derived macrophages and human haemopoietic cell lines.
Br J Haematol 2000; 108: 151-6.
- Hoffman SM, Nelson DR, Keeney DS.
Organization, structure and evolution of the CYP2 gene cluster on human chromosome 19.
Pharmacogenetics 2001; 11: 687-98.
- Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz NL.
Metabolism and disposition kinetics of nicotine.
Pharmacol Rev 2005; 57: 79-115.
- Humphries SE, Morgan L.
Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches.
Lancet Neurol 2004; 3: 227-35.
- Humphries SE, Martin S, Cooper J, Miller G.
Interaction between smoking and the stromelysin-1 (MMP3) gene 5A/6A promoter polymorphism and risk of coronary heart disease in healthy men.
Ann Hum Genet 2002; 66: 343-52.
- Humphries SE, Talmud PJ, Hawe E, Bolla M, Day IN, Miller GJ.
Apolipoprotein E4 and coronary heart disease in middle-aged men who smoke: a prospective study.
Lancet 2001; 358: 115-9.
- Iwano S, Asanuma F, Nukaya M, Saito T, Kamataki T.
CYP1A1-mediated mechanism for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons.
Biochem Biophys Res Commun. 2005; 337: 708-12.

- Janzon E, Hedblad B, Berglund G, Engstrom G.
Changes in blood pressure and body weight following smoking cessation in women.
J Intern Med. 2004; 255: 266-72.
- Jonsson E, Sedvall G, Brene S, Gustavsson JP, Geijer T, Terenius L, Crocq MA, Lannfelt L, Tylec A, Sokoloff P, Schwartz JC, Wiesel FA.
Dopamine-related genes and their relationships to monoamine metabolites in CSF.
Biol Psychiatry 1996; 40: 1032-43.
- Josselyn SA, Nguyen PV.
CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges.
Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2005; 4: 481-97.
- Kamataki T, Fujieda M, Kiyotani K, Iwano S, Kunitoh H.
Genetic polymorphism of CYP2A6 as one of the potential determinants of tobacco-related cancer risk.
Biochem Biophys Res Commun 2005; 338: 306-10.
- Kamataki T, Nunoya K, Sakai Y, Kushida H, Fujita K.
Genetic polymorphism of CYP2A6 in relation to cancer.
Mutat Res 1999 ; 428 : 125-30.
- Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB.
Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study.
JAMA 1987; 258: 1183-6.
- Karyala S, Guo J, Sartor M, Medvedovic M, Kann S, Puga A, Ryan P, Tomlinson CR.
Different global gene expression profiles in benzo[a]pyrene- and dioxin-treated vascular smooth muscle cells of AHR-knockout and wild-type mice.
Cardiovasc Toxicol 2004; 4: 47-73.
- Kawajiri K, Watanabe J, Eguchi H, Nakachi K, Kiyohara C, Hayashi S.
Polymorphisms of human Ah receptor gene are not involved in lung cancer.
Pharmacogenetics 1995; 5: 151-8.
- Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S.
Germ line polymorphisms of p53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer.
Carcinogenesis 1993; 14: 1085-9.
- Keavney B, Parish S, Palmer A, Clark S, Youngman L, Danesh J, McKenzie C, Delepine M, Lathrop M, Peto R, Collins R; International Studies of Infarct Survival (ISIS) Collaborators.
Large-scale evidence that the cardiotoxicity of smoking is not significantly modified by the apolipoprotein E epsilon2/epsilon3/epsilon4 genotype.
Lancet 2003; 361: 396-8.
- Kerzee JK, Ramos KS.
Constitutive and inducible expression of Cyp1a1 and Cyp1b1 in vascular smooth muscle cells: role of the Ahr bHLH/PAS transcription factor.
Circ Res 2001; 89: 573-82.
- Kharasch ED, Hankins DC, Taraday JK.
Single-dose methoxsalen effects on human cytochrome P-450 2A6 activity.
Drug Metab Dispos. 2000; 28: 28-33.
- Kitagawa K, Kunugita N, Kitagawa M, Kawamoto T.
CYP2A6*6, a novel polymorphism in cytochrome p450 2A6, has a single amino acid substitution (R128Q) that inactivates enzymatic activity.
J Biol Chem 2001; 276: 17830-5.
- Kiyohara C, Nakanishi Y, Inutsuka S, Takayama K, Hara N, Motohiro A, Tanaka K, Kono S, Hirohata T.
The relationship between CYP1A1 aryl hydrocarbon hydroxylase activity and lung cancer in a Japanese population.
Pharmacogenetics 1998; 8: 315-23.
- Kiyohara C, Hirohata T, Inutsuka S.
The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene.
Jpn J Cancer Res 1996; 87: 18-24.

Kiyotani K, Yamazaki H, Fujieda M, Iwano S, Matsumura K, Satarug S, Ujjin P, Shimada T, Guengerich FP, Parkinson A, Honda G, Nakagawa K, Ishizaki T, Kamataki T.
Decreased coumarin 7-hydroxylase activities and CYP2A6 expression levels in humans caused by genetic polymorphism in CYP2A6 promoter region (CYP2A6*9).
Pharmacogenetics 2003; 13: 689-95.

Kiyotani K, Fujieda M, Yamazaki H, Shimada T, Guengerich FP, Parkinson A, Nakagawa K, Ishizaki T, Kamataki T.
Twenty one novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2A6 gene in Japanese and Caucasians.
Drug Metab Pharmacokinet 2002; 17: 482-7.

Koenigs LL, Peter RM, Thompson SJ, Rettie AE, Trager WF.
Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P450 2A6 by 8-methoxypsoralen.
Drug Metab Dispos 1997; 25: 1407-15.

Koskela S, Hakkola J, Hukkanen J, Pelkonen O, Sorri M, Saranen A, Anttila S, Fernandez-Salguero P, Gonzalez F, Raunio H.
Expression of CYP2A genes in human liver and extrahepatic tissues.
Biochem Pharmacol 1999; 57: 1407-13.

Kratz F.
Coumarin-7-hydroxylase activity in microsomes from needle biopsies of normal and diseased human liver.
Europ. J. Clin. Pharm 1976; 10: 133-137.

Kubota T, Nakajima-Taniguchi C, Fukuda T, Funamoto M, Maeda M, Tange E, Ueki R, Kawashima K, Hara H, Fujio Y, Azuma J.
CYP2A6 polymorphisms are associated with nicotine dependence and influence withdrawal symptoms in smoking cessation.
Pharmacogenomics J 2006 (sous presse).

Kuo WW, Chu CY, Wu CH, Lin JA, Liu JY, Hsieh YH, Ueng KC, Lee SD, Hsieh DJ, Hsu HH, Chen LM, Huang CY.
Impaired IGF-I signalling of hypertrophic hearts in the developmental phase of hypertension in genetically hypertensive rats.
Cell Biochem Funct 2005; 23: 325-31.

Kurth T, Kase CS, Berger K, Gaziano JM, Cook NR, Buring JE.
Smoking and risk of hemorrhagic stroke in women.
Stroke 2003; 34: 2792-5 (a).

Kurth T, Kase CS, Berger K, Schaeffner ES, Buring JE, Gaziano JM.
Smoking and the risk of hemorrhagic stroke in men.
Stroke 2003; 34: 1151-5 (b).

Kwon JT, Nakajima M, Chai S, Yom YK, Kim HK, Yamazaki H, Sohn DR, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Yokoi T.
Nicotine metabolism and CYP2A6 allele frequencies in Koreans.
Pharmacogenetics 2001; 11: 317-23.

Lalouschek W, Schillinger M, Hsieh K, Endler G, Tentschert S, Lang W, Cheng S, Mannhalter C.
Matched case-control study on factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack up to the age of 60 years.
Stroke 2005; 36: 1405-9.

Lamba JK, Lamba V, Yasuda K, Lin YS, Assem M, Thompson E, Strom S, Schuetz E.
Expression of constitutive androstane receptor splice variants in human tissues and their functional consequences.
J Pharmacol Exp Ther 2004; 311: 811-21.

Lamba V, Yasuda K, Lamba JK, Assem M, Davila J, Strom S, Schuetz EG.
PXR (NR1I2): splice variants in human tissues, including brain, and identification of neurosteroids and nicotine as PXR activators.
Toxicol Appl Pharmacol 2004; 199: 251-65.

Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, Fackenthal JD, Rogan PK, Ring B, Wrighton SA, Schuetz EG.
Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression.
J Pharmacol Exp Ther 2003; 307: 906-22.

Lança V, Alcantara P, Braz-Nogueira J, Bicho MP.
Cytochrome P450 (CYP1A1) T6325C polymorphism might modulate essential hypertension-associated stroke risk.
Rev Port Cardiol 2003; 23: 343-355.

Lasker JM, Chen WB, Wolf I, Bloswick BP, Wilson PD, Powell PK.
Formation of 20-hydroxyecosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of Cyp4F2 and Cyp4A11.
J Biol Chem 2000; 275: 4118-26.

Lauterbach B, Barbosa-Sicard E, Wang MH, Honeck H, Kargel E, Theuer J, Schwartzman ML, Haller H, Luft FC, Gollasch M, Schunck WH.
Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators.
Hypertension 2002; 39: 609-13.

Lee DH, Ha MH, Kim JR, Jacobs DR Jr.
Effects of smoking cessation on changes in blood pressure and incidence of hypertension: a 4-year follow-up study.
Hypertension 2001; 37: 194-198.

Le Houezec J.
Nicotine: abused substance and therapeutic agent.
J Psychiatry Neurosci 1998; 23: 95-108.

Le Marchand L, Guo C, Benhamou S, Bouchardy C, Cascorbi I, Clapper ML, Garte S, Haugen A, Ingelman-Sundberg M, Kihara M, Rannug A, Ryberg D, Stucker I, Sugimura H, Taioli E.
Pooled analysis of the CYP1A1 exon 7 polymorphism and lung cancer (United States).
Cancer Causes Control 2003; 14: 339-46.

Lerman C, Jepson C, Wileyto EP, Epstein LH, Rukstalis M, Patterson F, Kaufmann V, Restine S, Hawk L, Niaura R, Berrettini W.
Role of Functional Genetic Variation in the Dopamine D2 Receptor (DRD2) in Response to Bupropion and Nicotine Replacement Therapy for Tobacco Dependence: Results of Two Randomized Clinical Trials.
Neuropsychopharmacology 2006; 31: 231-42.

Lerman C, Shields PG, Wileyto EP, Audrain J, Pinto A, Hawk L, Krishnan S, Niaura R, Epstein L.
Pharmacogenetic investigation of smoking cessation treatment.
Pharmacogenetics 2002; 12: 627-34.

Lerman C, Caporaso NE, Audrain J, Main D, Boyd NR, Shields PG.
Interacting effects of the serotonin transporter gene and neuroticism in smoking practices and nicotine dependence
Mol Psychiatry 2000; 5: 189-92.

Lerman C, Caporaso N, Main D, Audrain J, Boyd NR, Bowman ED, Shields PG. Related Articles, Links
Depression and self-medication with nicotine: the modifying influence of the dopamine D4 receptor gene.
Health Psychol 1998; 17: 56-62.

Lerman C, Audrain J, Orleans CT, Boyd R, Gold K, Main D, Caporaso N.
Investigation of mechanisms linking depressed mood to nicotine dependence.
Addict Behav 1996; 21: 9-19.

Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P.
Organization of the human serotonin transporter gene.
J Neural Transm Gen Sect 1994; 95: 157-62.

Lewis DF.
Essential requirements for substrate binding affinity and selectivity toward human CYP2 family enzymes.
Arch Biochem Biophys 2003; 409: 32-44.

Lewis DF, Lake BG, Dickins M, Goldfarb PS.
Homology modelling of CYP2A6 based on the CYP2C5 crystallographic template: enzyme-substrate interactions and QSARs for binding affinity and inhibition.
Toxicol In Vitro 2003; 17: 179-90.

Li MD, Beuten J, Ma JZ, Payne TJ, Lou XY, Garcia V, Duenes AS, Crews KM, Elston RC.
Ethnic- and gender-specific association of the nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit gene (CHRNA4) with nicotine dependence.
Hum Mol Genet 2005; 14: 1211-9.

Li R, Boerwinkle E, Olshan AF, Chambless LE, Pankow JS, Tyroler HA, Bray M, Pittman GS, Bell DA, Heiss G.
Glutathione S-transferase genotype as a susceptibility factor in smoking-related coronary heart disease.
Atherosclerosis 2000; 149: 451-62.

- Liang Y, Salas R, Marubio L, Bercovich D, De Biasi M, Beaudet al., Dani JA.
Functional polymorphisms in the human beta4 subunit of nicotinic acetylcholine receptors.
Neurogenetics 2005; 6: 37-44.
- Lin SJ, Hong CY, Chang MS, Chiang BN, Chien S. Related Articles, Links
Long-term nicotine exposure increases aortic endothelial cell death and enhances transendothelial macromolecular transport in rats.
Arterioscler Thromb 1992; 12: 1305-12.
- Liu PY, Li YH, Tsai WC, Tsai LM, Chao TH, Wu HL, Chen JH.
Stromelysin-1 promoter 5A/6A polymorphism is an independent genetic prognostic risk factor and interacts with smoking cessation after index premature myocardial infarction.
J Thromb Haemost 2005; 3: 1998-2005.
- London SJ, Idle JR, Daly AK, Coetzee GA.
Genetic variation of CYP2A6, smoking, and risk of cancer.
Lancet 1999; 353: 898-9.
- Loriot MA, Rebuissou S, Oscarson M, Cenee S, Miyamoto M, Ariyoshi N, Kamataki T, Hemon D, Beaune P, Stucker I.
Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2A6 in a case-control study on lung cancer in a French population.
Pharmacogenetics 2001; 11 :39-44.
- Lu T, VanRollins M, Lee HC.
Stereospecific activation of cardiac ATP-sensitive K(+) channels by epoxyeicosatrienoic acids: a structural determinant study.
Mol Pharmacol 2002; 62: 1076-83.
- Lund AK, Goens MB, Kanagy NL, Walker MK.
Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure.
Toxicol Appl Pharmacol 2003; 193: 177-187.
- Ma JZ, Beuten J, Payne TJ, Dupont RT, Elston RC, Li MD.
Haplotype analysis indicates an association between the DOPA decarboxylase (DDC) gene and nicotine dependence.
Hum Mol Genet 2005; 14: 1691-8.
- Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, Berliner J, Lusi AJ, Navab M, Shih D, Fonarow GC.
Paraoxonase and coronary heart disease.
Curr Opin Lipidol 1998; 9: 319-24.
- Mandal PK.
Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology.
J Comp Physiol [B] 2005; 175: 221-30.
- Mashiba J, Koike G, Kamiunten H, Ikeda M, Sunagawa K.
Vasospastic angina and microvascular angina are differentially influenced by PON1 A632G polymorphism in the Japanese.
Circ J 2005; 69: 1466-71.
- Mathonnet G, Krajcinovic M, Labuda D, Sinnett D.
Role of DNA mismatch repair genetic polymorphisms in the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia.
Br J Haematol 2003; 123: 45-8.
- McCarron MO, DeLong D, Alberts MJ.
APOE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease: a meta-analysis.
Neurology 1999; 53: 1308-11.
- McKinney EF, Walton RT, Yudkin P, Fuller A, Halder NA, Mant D, Murphy M, Welsh KI, Marshall SE.
Association between polymorphisms in dopamine metabolic enzymes and tobacco consumption in smokers.
Pharmacogenetics 2000; 10: 483-91.
- McNamara P, FitzGerald GA.
Smoking-induced vascular disease: a new twist on an old theme.
Circ Res. 2001; 89: 563-5.
- Maglich JM, Watson J, McMillen PJ, Goodwin B, Willson TM, Moore JT.
The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction.
J Biol Chem 2004; 279: 19832-8.

- Malaiyandi V, Sellers EM, Tyndale RF.
Implications of CYP2A6 genetic variation for smoking behaviors and nicotine dependence.
Clin Pharmacol Ther 2005; 77: 145-58.
- Mann SJ, James GD, Wang RS, Pickering TG.
Elevation of ambulatory systolic blood pressure in hypertensive smokers. A case-control study.
JAMA 1991; 265: 2226-8.
- Marszalec W, Yeh JZ, Narahashi T.
Desensitization of nicotine acetylcholine receptors: modulation by kinase activation and phosphatase inhibition.
Eur J Pharmacol 2005; 514: 83-90.
- Matyar S, Attila G, Acarturk E, Akpınar O, Inal T.
eNOS gene intron 4 a/b VNTR polymorphism is a risk factor for coronary artery disease in Southern Turkey.
Clin Chim Acta 2005; 354: 153-8.
- Meek MD, Finch GL.
Diluted mainstream cigarette smoke condensates activate estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene transcription.
Environ Res 1999; 80: 9-17.
- Messina ES, Tyndale RF, Sellers EM.
A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes.
J Pharmacol Exp Ther 1997; 282: 1608-14.
- Meunier V, Bourrie M, Julian B, Marti E, Guillou F, Berger Y, Fabre G.
Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up.
Xenobiotica 2000; 30: 589-607.
- Micka J, Milatovich A, Menon A, Grabowski GA, Puga A, Nebert DW.
Human Ah receptor (AHR) gene: localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP1A1 inducibility.
Pharmacogenetics 1997; 7: 95-101.
- Miksys S, Tyndale RF.
The unique regulation of brain cytochrome P450 2 (CYP2) family enzymes by drugs and genetics.
Drug Metab Rev 2004; 36: 313-33.
- Miksys S, Lerman C, Shields PG, Mash DC, Tyndale RF.
Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain.
Neuropharmacology 2003; 45: 122-32.
- Miles JS, Bickmore W, Brook JD, McLaren AW, Meehan R, Wolf CR.
Close linkage of the human cytochrome P450IIA and P450IIB gene subfamilies: implications for the assignment of substrate specificity.
Nucleic Acids Res 1989; 17: 2907-17.
- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y.
Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD.
Biochim Biophys Acta 2003; 1619: 263-8.
- Miyamoto M, Umetsu Y, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Kunitoh H, Nemoto N, Sato K, Ariyoshi N, Kamataki T.
CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer.
Biochem Biophys Res Commun 1999; 261(3): 658-60.
- Moliterno DJ, Willard JE, Lange RA, Negus BH, Boehrer JD, Glamann DB, Landau C, Rossen JD, Winniford MD, Hillis LD.
Coronary-artery vasoconstriction induced by cocaine, cigarette smoking, or both.
N Engl J Med 1994; 330: 454-9.
- Mooney LA, Bell DA, Santella RM, Van Bennekum AM, Ottman R, Paik M, Blaner WS, Lucier GW, Covey L, Young TL, Cooper TB, Glassman AH, Perera FP.
Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers.
Carcinogenesis 1997; 18: 503-9.

- Morozumi T, Kubota T, Sugita N, Itagaki M, Yoshie H.
Alterations of gene expression in human neutrophils induced by smoking cessation.
J Clin Periodontol 2004; 31: 1110-6.
- Munafo M, Clark T, Johnstone E, Murphy M, Walton R.
The genetic basis for smoking behavior: a systematic review and meta-analysis.
Nicotine Tob Res 2004; 6: 583-97.
- Murphy E. S, Johnson M. L, Pullo A. D.
Characterization of Multiple Products of Cytochrome P450 2A6-catalyzed Cotinine Metabolism.
Chem. Res Toxicol 1999; 12: 639-645.
- Mwenifumbo JC, Myers MG, Wall TL, Lin SK, Sellers EM, Tyndale RF.
Ethnic variation in CYP2A6*7, CYP2A6*8 and CYP2A6*10 as assessed with a novel haplotyping method.
Pharmacogenet Genomics 2005; 15: 189-92.
- Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Kawajiri K.
Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population.
Cancer Res 1993; 53: 2994-9.
- Nakajima M, Yokoi T.
Interindividual variability in nicotine metabolism: C-oxidation and glucuronidation.
Drug Metab Pharmacokinet 2005; 20: 227-35.
- Nakajima M, Yoshida R, Fukami T, McLeod HL, Yokoi T.
Novel human CYP2A6 alleles confound gene deletion analysis.
FEBS Lett 2004; 569: 75-81.
- Nakajima M, Kuroiwa Y, Yokoi T.
Interindividual differences in nicotine metabolism and genetic polymorphisms of human CYP2A6.
Drug Metab Rev 2002; 34: 865-77.
- Nakajima M, Kwon JT, Tanaka N, Zenta T, Yamamoto Y, Yamamoto H, Yamazaki H, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Yokoi T.
Relationship between interindividual differences in nicotine metabolism and CYP2A6 genetic polymorphism in humans.
Clin Pharmacol Ther 2001; 69: 72-8.
- Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T, Kuroiwa Y.
Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine.
Drug Metab Dispos 1996; 24: 1212-7.
- Nelson DR
Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution.
Arch Biochem Biophys 2003; 409: 18-24.
- Newby AC, Southgate KM, Davies M.
Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis.
Basic Res Cardiol 1994 ;89 :59-70.
- Nishikawa A, Mori Y, Lee IS, Tanaka T, Hirose M.
Cigarette smoking, metabolic activation and carcinogenesis.
Curr Drug Metab 2004; 5: 363-73.
- Noma K, Higashi Y, Jitsuiki D, Hara K, Kimura M, Nakagawa K, Goto C, Oshima T, Yoshizumi M, Chayama K.
Smoking activates rho-kinase in smooth muscle cells of forearm vasculature in humans.
Hypertension 2003; 41: 1102-5.
- Nordskog BK, Blixt AD, Zieske AW, Hellmann GM.
MMP-1 polymorphic expression in aortic endothelial cells: possible role in lesion development in smokers and nonsmokers.
Cardiovasc Toxicol 2004; 4: 75-83.
- Nordskog BK, Blixt AD, Morgan WT, Fields WR, Hellmann GM.
Matrix-degrading and pro-inflammatory changes in human vascular endothelial cells exposed to cigarette smoke condensate.
Cardiovasc Toxicol 2003;3: 101-17.

- Nunoya KI, Yokoi T, Kimura K, Kainuma T, Satoh K, Kinoshita M, Kamataki T (a).
A new CYP2A6 gene deletion responsible for the in vivo polymorphic metabolism of (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-one hydrochloride in humans.
J Pharmacol Exp Ther 1999; 289: 437-42 (a).
- Nunoya K, Yokoi T, Takahashi Y, Kimura K, Kinoshita M, Kamataki T.
Homologous unequal cross-over within the human CYP2A gene cluster as a mechanism for the deletion of the entire CYP2A6 gene associated with the poor metabolizer phenotype.
J Biochem 1999; 126: 402-7 (b).
- Nunoya K, Yokoi T, Kimura K, Inoue K, Kodama T, Funayama M, Nagashima K, Funae Y, Green C, Kinoshita M, Kamataki T.
A new deleted allele in the human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene found in individuals showing poor metabolic capacity to coumarin and (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-one hydrochloride (SM-12502).
Pharmacogenetics 1998; 8: 239-49.
- Okey AB, Franc MA, Moffat ID, Tijet N, Boutros PC, Korkalainen M, Tuomisto J, Pohjanvirta R.
Toxicological implications of polymorphisms in receptors for xenobiotic chemicals: The case of the aryl hydrocarbon receptor.
Toxicol Appl Pharmacol 2005; 207: 43-51.
- Okobia M, Bunker C, Zmuda J, Kammerer C, Vogel V, Uche E, Anyanwu S, Ezeome E, Ferrell R, Kuller L.
Cytochrome P4501A1 genetic polymorphisms and breast cancer risk in Nigerian women.
Breast Cancer Res Treat 2005; 94: 285-93.
- Okubo Y, Suwazono Y, Kobayashi E, Nogawa K.
An association between smoking habits and blood pressure in normotensive Japanese men: a 5-year follow-up study.
Drug Alcohol Depend. 2004; 73: 167-74.
- Oncken CA, White WB, Cooney JL, Van Kirk JR, Ahluwalia JS, Giacco S.
Impact of smoking cessation on ambulatory blood pressure and heart rate in postmenopausal women.
Am J Hypertens 2001; 14: 942-9.
- Oscarson M, McLellan RA, Asp V, Ledesma M, Ruiz ML, Sinues B, Rautio A, Ingelman-Sundberg M.
Characterization of a novel CYP2A7/CYP2A6 hybrid allele (CYP2A6*12) that causes reduced CYP2A6 activity.
Hum Mutat 2002; 20: 275-83.
- Oscarson M.
Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism.
Drug Metab Dispos 2001; 29: 91-5.
- Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, Yue QY, Lang MA, Bernal ML, Sinues B, Hirvonen A, Raunio H, Pelkonen O, Ingelman-Sundberg M.
Characterisation and PCR-based detection of a CYP2A6 gene deletion found at a high frequency in a Chinese population.
FEBS Lett. 1999; 448: 105-10 (a).
- Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, Agundez JA, Benitez J, Rautio A, Raunio H, Pelkonen O, Ingelman-Sundberg M.
Identification and characterisation of novel polymorphisms in the CYP2A locus: implications for nicotine metabolism.
FEBS Lett 1999; 460: 321-7 (b).
- Oscarson M, Gullsten H, Rautio A, Bernal ML, Sinues B, Dahl ML, Stengard JH, Pelkonen O, Raunio H, Ingelman-Sundberg M.
Genotyping of human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6), a nicotine C-oxidase.
FEBS Lett 1998; 438: 201-5.
- Pallaud C, Gueguen R, Sass C, Grow M, Cheng S, Siest G, Visvikis S.
Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas Cohort.
J Lipid Res 2001; 42: 1879-90.
- Pasanen M, Rannala Z, Tooming A, Sotaniemi EA, Pelkonen O, Rautio A.
Hepatitis A impairs the function of human hepatic CYP2A6 in vivo.
Toxicology 1997; 123: 177-84.
- Pianezza ML, Sellers EM, Tyndale RF.
Nicotine metabolism defect reduces smoking.
Nature 1998; 393: 750.

- Pitarque M, Rodriguez-Antona C, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M.
Transcriptional regulation of the human CYP2A6 gene.
J Pharmacol Exp Ther 2005; 313: 814-22.
- Pitarque M, von Richter O, Rodriguez-Antona C, Wang J, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M.
A nicotine C-oxidase gene (CYP2A6) polymorphism important for promoter activity.
Hum Mutat 2004; 23: 258-66.
- Pitarque M, von Richter O, Oke B, Berkkan H, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M.
Identification of a single nucleotide polymorphism in the TATA box of the CYP2A6 gene: impairment of its promoter activity.
Biochem Biophys Res Commun 2001; 284: 455-60.
- Pelkonen O, Rautio A, Raunio H, Pasanen M.
CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase.
Toxicology 2000; 144: 139-47.
- Pelkonen O, Sotaniemi EA, Ahokas JT.
Coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. Properties of the enzyme and interspecies comparisons.
Br J Clin Pharmacol 1985; 19: 59-66.
- Pitarque M, Rodriguez-Antona C, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M.
Transcriptional regulation of the human CYP2A6 gene.
J Pharmacol Exp Ther 2005; 313: 814-22.
- Pitarque M, von Richter O, Rodriguez-Antona C, Wang J, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M.
A nicotine C-oxidase gene (CYP2A6) polymorphism important for promoter activity.
Hum Mutat 2004; 23: 258-66.
- Pitarque M, Von Richter O, Oke B, Berkkan H, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M.
Identification of a single nucleotide polymorphism in the TATA box of the CYP2A6 gene: impairment of its promoter activity.
Biochem Biophys Res Commun 2001; 284: 455-60.
- Pomerleau OF, Pomerleau CS, Namerck RJ.
Early experiences with tobacco among women smokers, ex-smokers, and never-smokers.
Addiction 1998; 93: 595-9.
- Pomerleau OF.
Individual differences in sensitivity to nicotine: implications for genetic research on nicotine dependence.
Behav Genet 1995; 25: 161-77.
- Pomerleau OF, Hariharan M, Pomerleau CS, Cameron OG, Guthrie SK.
Differences between smokers and never-smokers in sensitivity to nicotine: a preliminary report.
Addiction 1993; 88: 113-8.
- Primates P, Falaschetti E, Gupta S, Marmot MG, Poulter NR.
Association between smoking and blood pressure: evidence from the health survey for England.
Hypertension 2001; 37: 187-93.
- Puga A, Tomlinson CR, Xia Y.
Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways.
Biochem Pharmacol 2005; 69: 199-207.
- Rahman M, Wright JT Jr, Douglas JG.
The role of the cytochrome P450-dependent metabolites of arachidonic acid in blood pressure regulation and renal function: a review.
Am J Hypertens 1997; 10: 356-65.
- Rao Y, Hoffmann E, Zia M, Bodin L, Zeman M, Sellers EM, Tyndale RF.
Duplications and defects in the CYP2A6 gene: identification, genotyping, and in vivo effects on smoking.
Mol Pharmacol 2000; 58: 747-55.
- Rasky E, Stronegger WJ, Freidl W.
The relationship between body weight and patterns of smoking in women and men.
Int J Epidemiol 1996; 25: 1208-12.

- Raunio H, Rautio A, Pelkonen O.
The CYP2A subfamily: function, expression and genetic polymorphism.
IARC Sci Publ 1999; 148: 197-207.
- Rautio A.
Polymorphic CYP2A6 and its clinical and toxicological significance.
Pharmacogenomics J 2003; 3: 5-7.
- Rautio A, Gullsten H, Pelkonen O.
Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences.
Br J Clin Pharmacol 2001; 52: 357-63.
- Raveendran M, Senthil D, Utama B, Shen Y, Dudley D, Wang J, Zhang Y, Wang XL.
Cigarette suppresses the expression of P4Halpa and vascular collagen production.
Biochem Biophys Res Commun 2004; 323: 592-8.
- Reuter M, Hennig J.
Pleiotropic effect of the TPH A779C polymorphism on nicotine dependence and personality.
Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005; 134: 20-4.
- Ribeiro EB, Bettiker RL, Bogdanov M, Wurtman RJ.
Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain.
Brain Res 1993; 621: 311-8.
- Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH.
Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men.
Circulation 2000; 101: 1767-72.
- Rifkind AB, Lee C, Chang TK, Waxman DJ.
Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxyoxygenation in human liver microsomes.
Arch Biochem Biophys 1995; 320: 380-9.
- Risley P, Jerrard-Dunne P, Sitzer M, Buehler A, von Kegler S, Markus HS; Carotid Atherosclerosis Progression Study
Promoter polymorphism in the endotoxin receptor (CD14) is associated with increased carotid atherosclerosis only in smokers: the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS).
Stroke 2003; 34: 600-4.
- Roman RJ.
P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function.
Physiol Rev 2002; 82: 131-85.
- Rontu R, Karhunen PJ, Ilveskoski E, Mikkelsen J, Kajander O, Perola M, Penttila A, Koivisto AM, Lehtimäki T.
Smoking-dependent association between paraoxonase 1 M/L55 genotype and coronary atherosclerosis in males: an autopsy study.
Atherosclerosis 2003; 171: 31-7.
- Rosner SA, Ridker PM, Zee RY, Cook NR.
Interaction between inflammation-related gene polymorphisms and cigarette smoking on the risk of myocardial infarction in the Physician's Health Study.
Hum Genet 2005; 118: 287-94.
- Sadek CM, Allen-Hoffmann BL.
Cytochrome P450IA1 is rapidly induced in normal human keratinocytes in the absence of xenobiotics.
J Biol Chem. 1994; 269: 16067-74.
- Schinka JA, Town T, Abdullah L, Crawford FC, Ordorica PI, Francis E, Hughes P, Graves AB, Mortimer JA, Mullan M.
A functional polymorphism within the mu-opioid receptor gene and risk for abuse of alcohol and other substances.
Mol Psychiatry 2002; 7: 224-8.
- Schoedel KA, Hoffmann EB, Rao Y, Sellers EM, Tyndale RF.
Ethnic variation in CYP2A6 and association of genetically slow nicotine metabolism and smoking in adult Caucasians.
Pharmacogenetics 2004; 14: 615-26.
- Schwarz D, Kisselev P, Chernogolov A, Schunck WH, Roots I.
Human CYP1A1 variants lead to differential eicosapentaenoic acid metabolite patterns.
Biochem Biophys Res Commun 2005; 336: 779-83.

- Schwarz D, Kisselev P, Erickson SS, Szkwarz GD, Chernogolov A, Honeck H, Schunck WH, Roots I.
Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid.
Biochem Pharmacol 2004; 67: 1445-57.
- Sellers EM, Ramamoorthy Y, Zeman MV, Djordjevic MV, Tyndale RF.
The effect of methoxsalen on nicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolism in vivo.
Nicotine Tob Res 2003; 5: 891-9.
- Sellers EM, Kaplan HL, Tyndale RF.
Inhibition of cytochrome P450 2A6 increases nicotine's oral bioavailability and decreases smoking.
Clin Pharmacol Ther 2000; 68: 35-43.
- Sen-Banerjee S, Siles X, Campos H.
Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2120-6.
- Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, Wang XL.
Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells.
DNA Cell Biol 2005; 24: 218-24.
- Shearman AM, Cooper JA, Kotwinski PJ, Humphries SE, Mendelsohn ME, Housman DE, Miller GJ.
Estrogen receptor alpha gene variation and the risk of stroke.
Stroke 2005; 36: 2281-2.
- Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ.
Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis.
Nature 1998; 394: 284-7.
- Shimada T, Fujii-Kuriyama Y.
Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1.
Cancer Sci 2004; 95: 1-6.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Wakamiya N, Ueng YF, Guengerich FP, Inui Y.
Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs.
Drug Metab Dispos 1996; 24: 515-22.
- Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C, *et al.*
Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk : the Stanislas cohort.
Clin Chem Lab Med 1998; 36: 35-42.
- Silverman MA, Neale MC, Sullivan PF, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Ma Y, Kendler KS, Straub RE.
Haplotypes of four novel single nucleotide polymorphisms in the nicotinic acetylcholine receptor beta2-subunit (CHRNA2) gene show no association with smoking initiation or nicotine dependence.
Am J Med Genet 2000; 96: 646-53.
- Smart J, Daly AK.
Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms.
Pharmacogenetics 2000; 10: 11-24.
- Smits KM, Benhamou S, Garte S, Weijenberg MP, Alamanos Y, Ambrosone C *et al.*
Association of metabolic gene polymorphisms with tobacco consumption in healthy controls.
Int J Cancer. 2004; 110: 266-70.
- Sobstyl J, Dzida G, Puzniak A, Mosiewicz J, Hanzlik J.
Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in Polish patients with myocardial infarction.
Ann Univ Mariae Curie Skłodowska 2002; 57: 21-8.
- Stein MD, Weinstock MC, Herman DS, Anderson BJ.
Respiratory symptom relief related to reduction in cigarette use.
J Gen Intern Med 2005; 20: 889-94.

- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL.
Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.
N Engl J Med. 1989; 320: 915-24.
- Stephens JW, Humphries SE.
The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications.
J Intern Med 2003; 253: 120-7.
- Stucker I, de Waziers I, Cenee S, Bignon J, Depierre A, Milleron B, Beaune P, Hemon D.
GSTM1, smoking and lung cancer: a case-control study.
Int J Epidemiol 1999; 28: 829-35.
- Su T, Bao Z, Zhang QY, Smith TJ, Hong JY, Ding X.
Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone.
Cancer Res 2000; 60: 5074-9.
- Takeuchi H, Saoo K, Yokohira M, Ikeda M, Maeta H, Miyazaki M, Yamazaki H, Kamataki T, Imaida K.
Pretreatment with 8-methoxypsoralen, a potent human CYP2A6 inhibitor, strongly inhibits lung tumorigenesis induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in female A/J mice.
Cancer Res 2003; 63: 7581-3.
- Talmud PJ, Stephens JW, Hawe E, Demissie S, Cupples LA, Hurel SJ, Humphries SE, Ordovas JM.
The significant increase in cardiovascular disease risk in APOEepsilon4 carriers is evident only in men who smoke: potential relationship between reduced antioxidant status and ApoE4.
Ann Hum Genet 2005; 69: 613-22.
- Talmud PJ, Hawe E, Miller GJ.
Analysis of gene-environment interaction in coronary artery disease: lipoprotein lipase and smoking as examples.
Ital Heart J 2002; 3: 6-9.
- Talmud PJ, Bujac SR, Hall S, Miller GJ, Humphries SE.
Substitution of asparagine for aspartic acid at residue 9 (D9N) of lipoprotein lipase markedly augments risk of ischaemic heart disease in male smokers.
Atherosclerosis 2000; 149: 75-81.
- Tanis BC, Bloemenkamp DG, van den Bosch MA, Kemmeren JM, Algra A, van de Graaf Y, Rosendaal FR.
Prothrombotic coagulation defects and cardiovascular risk factors in young women with acute myocardial infarction.
Br J Haematol 2003; 122: 471-8.
- Thackaberry EA, Gabaldon DM, Walker MK, Smith SM.
Aryl hydrocarbon receptor null mice develop cardiac hypertrophy and increased hypoxia-inducible factor-1alpha in the absence of cardiac hypoxia.
Cardiovasc Toxicol 2002; 2: 263-74.
- Thompson J, Thomas N, Singleton A, Piggott M, Lloyd S, Perry EK, Morris CM, Perry RH, Ferrier IN, Court JA.
D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele.
Pharmacogenetics 1997; 7: 479-84.
- Thum T, Borlak J.
Gene expression in distinct regions of the heart.
Lancet 2000; 355: 979-83.
- Tritto T, Marley RJ, Bastidas D, Stitzel JA, Collins AC.
Potential regulation of nicotine and ethanol actions by alpha4-containing nicotinic receptors.
Alcohol 2001; 24: 69-78.
- Tsuchiya Y, Sato T, Kiyohara C, Yoshida K, Ogoshi K, Nakamura K, Yamamoto M.
Genetic polymorphisms of cytochrome P450 1A1 and risk of gallbladder cancer.
J Exp Clin Cancer Res 2002; 21: 119-24.
- Tutka P, Mosiewicz J, Wielosz M.
Pharmacokinetics and metabolism of nicotine.
Pharmacol Rep 2005; 57: 143-53.

Tyndale RF, Sellers EM.
Variable CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior and risk.
Drug Metab Dispos 2001; 29: 548-52.

Ujii P, Satarug S, Vanavanitkun Y, Daigo S, Ariyoshi N, Yamazaki H, Reilly PE, Moore MR, Kamataki T.
Variation in coumarin 7-hydroxylase activity associated with genetic polymorphism of cytochrome P450 2A6 and the body status of iron stores in adult Thai males and females.
Pharmacogenetics 2002; 12: 241-9.

Um JY, Kim HM, Han SH, Cho KH, Moon BS, Hong SH.
Glutathione s-transferase gene polymorphism and ischemic cerebrovascular disease.
Int J Neurosci 2006; 116: 55-65.

Vasconcelos GM, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G.
CYP2A6 genetic polymorphisms and correlation with smoking status in Brazilians.
Pharmacogenomics J 2005 ;5:42-8.

Veyssier Belot C.
Fumée de tabac et risque cardiovasculaire.
Rev Med Interne 1997; 18: 702-8.

Von Richter O, Pitarque M, Rodriguez-Antona C, Testa A, Mantovani R, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M.
Polymorphic NF-Y dependent regulation of human nicotine C-oxidase (CYP2A6).
Pharmacogenetics 2004; 14: 369-79.

Walters CL, Cleck JN, Kuo YC, Blendy JA.
Mu-opioid receptor and CREB activation are required for nicotine reward.
Neuron. 2005; 46: 933-43.

Wang XL, Wang J.
Smoking-gene interaction and disease development: relevance to pancreatic cancer and atherosclerosis.
World J Surg 2005; 29: 344-53.

Wang XL, Raveendran M, Wang J.
Genetic influence on cigarette-induced cardiovascular disease.
Prog Cardiovasc Dis 2003; 45: 361-82 (a).

Wang J, Deng Y, Li L, Kuriki K, Ding J, Pan X, Zhuge X, Jiang J, Luo C, Lin P, Tokudome S.
Association of GSTM1, CYP1A1 and CYP2E1 genetic polymorphisms with susceptibility to lung adenocarcinoma: a case-control study in Chinese population.
Cancer Sci 2003;94:448-52 (b).

Wang XL, Greco M, Sim AS, Duarte N, Wang J, Wilcken DE.
Effect of CYP1A1 MspI polymorphism on cigarette smoking related coronary artery disease and diabetes.
Atherosclerosis 2002; 162: 391-7.

Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J.
Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study.
J Am Coll Cardiol 1999; 34: 1975-81.

Willett WC, Green A, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA, Rosner B, Monson RR, Stason W, Hennekens CH.
Relative and absolute excess risks of coronary heart disease among women who smoke cigarettes.
N Engl J Med 1987; 317: 1303-9.

Wiley JC, Coy EL, Frampton MW, Torres A, Apostolakis MJ, Hoehn G, Schuermann WH, Thilly WG, Olson DE, Hammersley JR, Crespi CL, Utell MJ.
Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers.
Am J Respir Cell Mol Biol 1997; 17: 114-24.

Wise RA.
Drug-activation of brain reward pathways.
Drug Alcohol Depend 1998; 51: 13-22.

- Wong JM, Okey AB, Harper PA.
Human aryl hydrocarbon receptor polymorphisms that result in loss of CYP1A1 induction.
Biochem Biophys Res Commun 2001; 288: 990-6.
- Wood A. W and Conney, A. H.
Genetic variation in coumarin hydroxylase activity in mouse (*Mus musculus*).
Science 1974; 185: 612-614.
- Wright JL, Tai H, Churg A.
Cigarette smoke induces persisting increases of vasoactive mediators in pulmonary arteries.
Am J Respir Cell Mol Biol 2004; 31: 501-9.
- Xu C, Rao YS, Xu B, Hoffmann E, Jones J, Sellers EM, Tyndale RF.
An in Vivo Pilot Study Characterizing the New CYP2A6*7, *8, and *10 Alleles.
Biochem Biophys Res Commun 2002; 290: 318-24
- Yamanaka H, Nakajima M, Fukami T, Sakai H, Nakamura A, Katoh M, Takamiya M, Aoki Y, Yokoi T (a).
CYP2A6 and CYP2B6 are involved in nornicotine formation from nicotine in humans: Interindividual differences in these contributions.
Drug Metab Dispos 2005; 33: 1811-8.
- Yamanaka H, Nakajima M, Katoh M, Kanoh A, Tamura O, Ishibashi H, Yokoi T (b).
Trans-3'-hydroxycotinine O- and N-glucuronidations in human liver microsomes.
Drug Metab Dispos 2005; 33: 23-30.
- Yamano S, Tatsuno J, Gonzalez FJ.
The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes.
Biochemistry 1990; 29: 1322-9.
- Yamazaki H, Inoue K, Hashimoto M, Shimada T.
Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes.
Arch Toxicol 1999; 73: 65-70.
- Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM.
Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression.
J Biol Chem 1996; 271: 13055-60.
- Yoshida R, Nakajima M, Nishimura K, Tokudome S, Kwon JT, Yokoi T.
Effects of polymorphism in promoter region of human CYP2A6 gene (CYP2A6*9) on expression level of messenger ribonucleic acid and enzymatic activity in vivo and in vitro.
Clin Pharmacol Ther 2003; 74: 69-76.
- Yoshida R, Nakajima M, Watanabe Y, Kwon JT, Yokoi T.
Genetic polymorphisms in human CYP2A6 gene causing impaired nicotine metabolism.
Br J Clin Pharmacol 2002; 54, 511-7.
- Zabetian CP, Gelernter J, Cubells JF.
Functional variants at CYP2A6: new genotyping methods, population genetics, and relevance to studies of tobacco dependence.
Am J Med Genet 2000; 96: 638-45.
- Zeiger AM.
Endothelial vasodilator dysfunction: pathogenetic link to myocardial ischaemia or epiphenomenon?
Lancet 1996; 348: s10-2.
- Zevin S, Benowitz NL.
Drug interactions with tobacco smoking. An update.
Clin Pharmacokinet 1999; 36: 425-438.
- Zevin S, Gourlay SG, Benowitz NL.
Clinical pharmacology of nicotine.
Clin Dermatol 1998; 16: 557-64.
- Zhang Y, Oltman CL, Lu T, Lee HC, Dellsperger KC, VanRollins M.
EET homologs potently dilate coronary microvessels and activate BK(Ca) channels.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 280: H2430-40.

Zhao W, Parrish AR, Ramos KS.

Constitutive and inducible expression of cytochrome P450IA1 and P450IB1 in human vascular endothelial and smooth muscle cells.

In Vitro Cell Dev Biol Anim 1998; 34: 671-3.

Zukunft J, Lang T, Richter T, Hirsch-Ernst KI, Nussler AK, Klein K, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM.

A natural CYP2B6 TATA box polymorphism (-82T--> C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site.

Mol Pharmacol 2005; 67: 1772-82.



Prénom, Nom : **Nicolas GAMBIER**

Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER N° 1175

Nancy, le 9 mai 2006

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



RESUME

Les maladies cardiovasculaires sont des affections multifactorielles où l'environnement joue un rôle important tout comme la génétique. Si le rôle nocif du tabac sur l'appareil cardiovasculaire est désormais solidement établi par les études épidémiologiques, son ou ses modes d'action sont moins bien connus.

Parmi les systèmes impliqués dans la transformation des constituants du tabac, les cytochromes P450 occupent une place importante. CYP1A1 et CYP2A6 sont responsables du métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques et de la nicotine contenus dans la fumée de cigarette mais aussi les substances endogènes comme l'acide arachidonique dont les fonctions métaboliques sont cruciales.

Les composants de la fumée de cigarette se révèlent à la fois substrats et inducteurs du CYP1A1. Cette induction est également modulée par le facteur de régulation du CYP1A1, le récepteur AhR, lui-même induit par les composants de la fumée de tabac. La nicotine est le principal composé responsable de la dépendance physique. Il est reconnu que le cytochrome P450 2A6 est la voie principale (80%) d'oxydation de la nicotine en cotinine.

Notre objectif a été l'investigation de l'influence des polymorphismes génétiques *CYP1A1* T3801C, et *AhR* R554K sur la pression artérielle en fonction du statut tabagique et d'étudier l'influence du polymorphisme *CYP2A6*1B* sur la quantité de tabac consommée dans un échantillon de la population saine de la cohorte STANISLAS.

La pression artérielle systolique (PAS) et diastolique (PAD) diffèrent significativement en fonction du polymorphisme *CYP1A1* T3801C entre les anciens fumeurs et fumeurs et l'interaction entre les polymorphismes *CYP1A1* T3801C et *AhR* R554K révèle une différence significative de la PAS et PAD chez les sujets porteurs à la fois des allèles *CYP1A1* T3801C et *AhR* R554K.

De plus, nous avons constaté que les individus porteurs du génotype *CYP2A6*1B/CYP2A6*1B* fument un nombre significativement plus élevé de cigarettes que les sujets génotypés *CYP2A6*1A/CYP2A6*1A*, ce qui démontre une association entre le polymorphisme *CYP2A6*1B* et le tabac, facteur de risque des maladies cardiovasculaires, d'autant plus que ce risque de survenue de pathologies cardiovasculaires est corrélé au nombre de cigarettes fumées par jour.

Ce travail met en lumière l'importance de l'interaction entre les variations génétiques des gènes P450 et les facteurs environnementaux tel que le tabac. Ces polymorphismes *CYP450* pourraient être considérés comme de nouveaux gènes candidats dans la dépendance au tabac et dans la régulation de la pression artérielle.

MOTS-CLES : CYP2A6 ; CYP1A1 ; AhR ; Polymorphismes ; Tabagisme ; Nicotine ; Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; Génotypage ; Maladies cardiovasculaires.