



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>

THESE

Présentée et soutenue publiquement
le 23 juin 2008

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

HENRI POINCARÉ – Nancy I

Mention Epidémiologie et Santé Publique

par **Elise JEANNESSON**

Née le 25 octobre 1979

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies de Pharmacologie Clinique

Sujet :

**ANALYSE GENOMIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE D'ABCB1
EN PHYSIOPATHOLOGIE CARDIOVASCULAIRE**

MEMBRES DU JURY

Co-directeurs de thèse : M. le Professeur Gérard SIEST (Nancy, France)
Mme le Docteur Sophie VISVIKIS-SIEST (Nancy, France)

Rapporteurs : Mme le Docteur Maryse GUERIN (Paris, France)
Mme le Professeur Julia KIRCHHEINER (Ulm, Allemagne)

Juges : Mme le Docteur Roselyne GARNOTEL (Reims, France)
M. le Professeur Jean-Louis MERLIN (Nancy, France)

Invités : M. le Docteur Marc MERTEN (Nancy, France)
M. le Professeur Claude MULLER (Luxembourg, Luxembourg)

Laboratoire de rattachement : INSERM « Génétique Cardiovasculaire – CIC 9501 »
Université Henri Poincaré – Nancy I
Faculté de Pharmacie - Nancy

REMERCIEMENTS

Tous mes remerciements au Pr Siest pour m'avoir encadrée tout au long de ces quatre années de doctorat et au Dr Visvikis-Siest pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et avoir co-dirigé ce travail.

Merci au Pr Zannad de m'avoir accueillie au Centre d'Investigation Clinique du CHU de Nancy et de m'avoir permis d'accéder à la population de l'étude HYDROGENE. Un grand merci également au Dr Anna Kearney-Schwartz pour m'avoir guidée dans le travail effectué au CIC.

Je remercie Bérangère Marie, Bernard Herbeth et Renaud Fay pour leur aide statistique et méthodologique très précieuse.

Merci à Michèle pour son encadrement méthodologique et technique ainsi qu'à Suzanne et Christine pour leur précieux soutien technique.

Merci aux Professeurs Schmitz et Aslanidis de l'Université-Hôpital de Regensburg, Allemagne, et au Dr Véra Ribeiro-Markes et ses étudiants, en particulier Ana-Margarita Gomes, de l'Université de l'Algarve, Portugal, pour leur encadrement et leur accueil chaleureux lors de mes séjours de collaboration dans leurs laboratoires.

Merci à tous les membres passés et présents du laboratoire qui m'ont entourée au quotidien lors de ces cinq années de DEA puis de thèse.

Un merci aux amis qui m'ont soutenue moralement tout au long de ce travail et plus particulièrement à Séverine et Rania.

Un immense merci à mes parents, mon frère et ma famille pour m'avoir soutenue tout au long de mes études. Plus particulièrement, je souhaite adresser toute ma reconnaissance à mon père, le Pr Pierre Jeannesson, pour m'avoir donné l'exemple d'une carrière universitaire satisfaisante personnellement et professionnellement et pour m'avoir accordé de nombreux conseils et discussions scientifiques et méthodologiques tout au long de ce travail.

Pour finir, toute ma gratitude aux membres du jury pour avoir acceptés de juger ce travail.

LISTE DES PUBLICATIONS

REVUES :

1) Siest G, *Jeannesson E*, Berrahmoune H, Maumus S, Marteau JB, Mohr S and Visvikis-Siest S. Pharmacogenomics and drug response in cardiovascular disorders. *Pharmacogenomics*. 2004; 5 (7):779-802

2) Siest G, Marteau JB, Maumus S, Berrahmoune H, *Jeannesson E* Samara A, Batt AM and Visvikis-Siest S. Pharmacogenomics and cardiovascular drugs: need for integrated biological system with phenotypes and proteomic markers. *Eur J Pharmacol*. 2005; 527 (1-3):1-22

AUTRES REVUES :

Siest G, *Jeannesson E*, Visvikis-Siest S. Enzymes and pharmacogenetics of cardiovascular drugs. *Clin Chim Acta*. 2007; 381(1):26-31

Siest G, Marteau JB, Maumus S, Berrahmoune H, *Jeannesson E*, Samara A, Batt AM and Visvikis-Siest S. Pharmacogenomics and pharmacoproteomics: a strategy for cardio-vascular drugs. *Ann Pharm Fr*. 2007; 65 (3):203-10. French

Marteau JB, Gambier N, *Jeannesson E*, Siest G and Visvikis-Siest S. Pharmacogenomics and antihypertensive drugs: a path toward personalized medicine. *Personalized Medicine*. 2007; 4 (4):393-412.

ARTICLES :

1) *Jeannesson E*, Albertini L, Siest G, Gomes AM, Ribeiro V, Aslanidis C, Schmitz G and Visvikis-Siest S. Frequencies of ABCB1 polymorphisms and haplotypes in a French population. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007; 21 (4):411-8

2) *Jeannesson E*, Siest G, Bastien B, Albertini L, Aslanidis C, Schmitz G, and Visvikis-Siest S. Association of ABCB1 polymorphisms with lipid and apolipoprotein concentrations in the Stanislas Cohort. *Soumis pour publication*.

3) Siest G, *Jeannesson E*, Marteau JB, Samara A, Marie B, Pfister M and Visvikis-Siest S. Transcription factors and drug metabolizing enzymes genes expression in lymphocytes from human healthy subjects. *Drug Metab Dispos*. 2008 ; 36 (1):182-9

4) *Jeannesson E* et al.

ABCB1 and PXR expressions in PBMCs are not associated with lipid and apolipoprotein concentrations in the Stanislas Cohort. *En cours de rédaction*.

5) *Jeannesson E*, Siest G, Zaiou M, Berrahmoune H, Masson S and Visvikis-Siest S. Genetic profiling of human cell lines used as in vitro model in cardiovascular pathophysiology and pharmacotoxicology. *Soumis pour publication*.

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Comparaison de la consommation de médicaments cardio-vasculaires au Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre-lès-Nancy en 1992 et 2000.

Figure 2 : Métabolisme du cholestérol et cibles moléculaires des médicaments existants ou en développement contre l'athérosclérose.

Figure 3 : Evolution annuelle de la consommation d'hypolipémiants au CMP et des ventes de la CERP-Lorraine entre 1991 et 2000.

Figure 4 : Evolution annuelle de la consommation de statines et de fibrates au CMP.

Figure 5 : Voies d'entrée et de sortie du cholestérol de l'organisme.

Figure 6 : Absorption intestinale du cholestérol par l'entérocyte.

Figure 7 : Voies métaboliques impliquées dans le trafic des stérols alimentaires.

Figure 8 : Evolution de la formation de la plaque athérosclérotique

Figure 9 : Approche en 5 étapes de l'individualisation du traitement médicamenteux des pathologies cardio-vasculaires.

Figure 10 : Les différentes phases du processus de détoxification.

Figure 11 : Les différentes phases du métabolisme et du transport des xénobiotiques.

Figure 12 : Rôles attribués aux CYP450.

Figure 13 : Part de chaque enzyme de phase I dans la phase I du métabolisme des médicaments.

Figure 14 : Part de chaque enzyme de phase II dans la phase II du métabolisme des médicaments.

Figure 15 : Différents types de transporteurs ABC.

Figure 16 : Transporteurs ABC et homéostasie des lipides.

Figure 17 : Structure en 2 dimensions du transporteur ABCB1.

Figure 18 : Représentation en 3 dimensions du transporteur ABCB1.

Figure 19 : Schéma du gène *ABCB1*, de l'ARNm, et de la structure secondaire de la protéine correspondante.

Figure 20 : Représentation schématique de la région 5' régulatrice du gène *ABCB1* avec les différents sites de fixation des facteurs de transcription.

Figure 21 : Mécanisme d'action moléculaire de PXR.

Figure 22 : Implication d'ABCB1 dans le trafic du cholestérol cellulaire.

MATERIEL & METHODES

Figure 23 : Principe d'un cycle de PCR.

Figure 24 : Principe de la détection colorimétrique associée à la PCR Multiplex.

Figure 25 : Lecture des bandelettes de détection.

Figure 26 : Profils de restriction obtenus pour les polymorphismes étudiés par PCR-RFLP.

Figure 27 : Résultats des appariements et des mésappariements entre les séquences cibles et sondes dans les essais utilisant la technologie TaqMan.

Figure 28 : Utilisation de la fluorescence dans la technologie TaqMan.

Figure 29 : Résumé de la procédure de génotypage utilisant la technologie TaqMan.

Figure 30: Détermination des génotypes en fonction du type de fluorescence.

Figure 31 : Représentation schématique du mode d'action du SYBR Green.

Figure 32 : Courbes de fusion.

Figure 33 : Courbes de quantification.

RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 34 : Déséquilibres de liaison observés chez les parents entre les 8 polymorphismes d'ABCB1 étudiés.

Figure 35 : Taux d'Apolipoprotéine A1 plasmatique en fonction du génotype pour ABCB1 C3435T dans l'ensemble de l'échantillon STANISLAS étudié et chez les hommes et les femmes séparément.

Figure 36 : Taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques en fonction du génotype pour ABCB1 T-76A (A) C1236T (B) et G2677W (C) chez les femmes.

Figure 37 : Taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques en fonction du génotype pour ABCB1 G-1A chez les femmes.

Figure 38 : Expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques chez 20 sujets de la cohorte STANISLAS.

Figure 39 : Expression de facteurs de transcription chez 20 sujets de la cohorte STANISLAS.

Figure 40 : Corrélation entre l'expression de PXR et des CYP2Cs dans les PBMCs des 20 sujets étudiés.

Figure 41 : Corrélation entre l'expression de PXR et des CYPs impliqués dans la régulation de la pression artérielle via différents métabolites actifs (eicosanoïdes, acides gras et stéroïdes) dans les PBMCs des 20 sujets étudiés.

Figure 42 : Corrélation entre l'expression d'ARNT, d'Ahr et de CYP1A1 dans les PBMCs des 20 sujets étudiés.

Figure 43 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et l'âge.

Figure 44 : Expression d'ABCB1 en fonction de la classe d'âge.

Figure 45 : Expression d'ABCB1 en fonction de l'IMC.

Figure 46 : Expression d'ABCB1 chez les sujets ayant un IMC < 25 et chez ceux ayant un IMC > 25.

Figure 47 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et le taux de lymphocytes chez les femmes exclusivement.

Figure 48 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et le taux de GGT.

Figure 49 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et le taux de TGP.

Figure 50 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et le taux de PAL chez les femmes exclusivement.

Figure 51 : Expression de PXR en fonction du sexe.

Figure 52 : Corrélation entre l'expression de PXR et le taux de GGT.

Figure 53 : Corrélation entre l'expression de PXR et le taux de TGO.

Figure 54 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et de PXR.

Figure 55 : Corrélation entre l'expression de PXR par puce d'expression et par RT-PCR en temps réel dans les PBMCs.

Figure 56 : Corrélation expression ABCB1 & taux de Triglycérides dans la population totale.

Figure 57 : Corrélation expression ABCB1 & taux de HDL chez les hommes.

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau I : Les différents facteurs de risque cardio-vasculaires identifiés.

Tableau II : Proportion de consommateurs de médicaments au CMP en 1992 et 2000.

Tableau III : Principales enzymes et transporteurs associés au métabolisme des xéno et endobiotiques.

Tableau IV : Fonctions métaboliques des Cytochrome P450.

Tableau V : Endobiotiques substrats des UGTs.

Tableau VI : Localisations, fonctions et pathologies associées aux principaux transporteurs ABC.

Tableau VII : Polymorphismes du transporteur ABCB1 d'intérêt.

Tableau VIII : Substrats, inducteurs et inhibiteurs exogènes du transporteur ABCB1.

Tableau IX : Revue de la littérature des dix dernières années : enzymes du métabolisme des xénobiotiques et facteurs de transcription décrits dans les PBMCs de sujets sains.

MATERIEL & METHODES

Tableau X : Composition du mixe réactionnel pour un échantillon de PCR Multiplex.

Tableau XI : Conditions d'amplification pour le Multiplex II et pour le Multiplex III.

Tableau XII : Protocole de PCR et de détection Multiplex.

Tableau XIII : Programmes de PCR.

Tableau XIV : Séquences des amorces.

Tableau XV : Enzymes de restriction, sites de reconnaissance et longueur des fragments de RFLP.

Tableau XVI : Références des mixes de sondes TaqMan utilisés dans cette étude.

Tableau XVII : Conditions de PCR.

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XVIII : Caractéristiques de l'échantillon STANISLAS étudié en fonction du sexe et du statut parents/enfants.

Tableau XIX : Fréquences alléliques et génotypiques observées dans l'échantillon étudié (n=371).

Tableau XX : Haplotypes estimés de fréquence supérieure à 3% dans notre population à partir des 8 polymorphismes.

Tableau XXI : Haplotypes estimés dans notre échantillon à partir des 4 polymorphismes les plus fréquents C1236T, T-76A, G2677W et C3435T.

Tableau XXII : Comparaison des fréquences génotypiques des polymorphismes d'ABCB1 entre notre population parentale et d'autres populations Caucasiennes.

Tableau XXIII : Taux d'ApoA1 dans l'échantillon global en fonction des haplotypes obtenus en considérant les polymorphismes G-1A, C1236T, T-76A, G2677W et C3435T.

Tableau XXIV : Description des polymorphismes d'intérêt des gènes codant les transporteurs *ABCA1* et *ABCG8*.

Tableau XXV : Fréquences génotypiques des polymorphismes d'*ABCA1* et d'*ABCG8* dans l'échantillon de la cohorte STANISLAS étudié.

Tableau XXVI : Associations entre polymorphismes d'*ABCA1* et paramètres biologiques chez les femmes (3 groupes).

Tableau XXVII : Associations entre polymorphismes d'*ABCA1* et d'*ABCG8* et paramètres biologiques chez les femmes (2 groupes).

Tableau XXVIII : Estimation des corrélations familiales pour les taux d'ApoA1 dans l'échantillon de la cohorte STANISLAS étudié.

Tableau XXIX : Estimation des corrélations familiales pour les taux de HDL dans l'échantillon de la cohorte STANISLAS étudié.

Tableau XXX : Caractéristiques des groupes cas et témoins de l'étude HYDROGENE.

Tableau XXXI : Caractéristiques des groupes cas et témoins en fonction du sexe de l'étude HYDROGENE.

Tableau XXXII : Génotypes des cas et des témoins HYDROGENE pour les polymorphismes d'*ABCB1*.

Tableau XXXIII : Comparaison des effectifs des génotypes pour les polymorphismes d'*ABCB1* entre cas et témoins de l'étude HYDROGENE.

Tableau XXXIV : Association entre les polymorphismes d'*ABCB1* et le taux de triglycérides plasmatiques chez les témoins de l'étude HYDROGENE.

Tableau XXXV : Association entre les polymorphismes d'*ABCB1* et les taux de cholestérol, LDL et ApoB chez les témoins de l'étude HYDROGENE.

Tableau XXXVI : Synthèse des associations significatives entre présence d'un allèle muté et taux de lipides ou d'apolipoprotéines plasmatiques dans chacun des 3 groupes étudiés.

Tableau XXXVII : Caractéristiques des 20 sujets ayant fait l'objet d'une étude par puce d'expression.

Tableau XXXVIII : Caractéristiques cliniques et biologiques des 83 sujets de la cohorte STANISLAS ayant fait l'objet d'une étude par RT-PCR en temps réel.

Tableau XXXIX : Répartition des génotypes observés dans l'échantillon de RT-PCR.

Tableau XL : Comparaison de la répartition des génotypes entre l'échantillon étudié en RT-PCR et l'échantillon parental étudié lors de l'analyse génétique.

Tableau XLI : Corrélations entre différentes variables biologiques et génétiques et l'expression de l'ARNm d'ABCB1 dans les PBMCs.

Tableau XLII : Comparaison de l'expression d'ABCB1 en fonction des génotypes pour *ABCB1* C1236T, T-76A, G2677W et C3435T.

Tableau XLIII : Corrélations significatives entre expression d'ABCB1 et différentes variables après analyse de régression multiple.

Tableau XLIV : Expression d'ABCB1 dans les PBMCs de sujets sains ou malades. Effet des polymorphismes d'ABCB1.

Tableau XLV : Corrélations entre différentes variables et l'expression de l'ARNm de PXR dans les PBMCs.

Tableau XLVI : Comparaison de l'expression de PXR en fonction des génotypes pour *ABCB1* C1236T, T-76A, G2677W et C3435T.

Tableau XLVII : Corrélations significatives entre expression de PXR et différentes variables après analyse de régression multiple.

Tableau XLVIII : Résultats de l'étude d'expression de PXR par puce à ADNc et par RT-PCR.

Tableau XLIX : Corrélations entre différentes variables biologiques et l'expression de l'ARNm d'ABCB1 et de PXR dans les PBMCs.

Tableau L : Corrélations entre taux de lipides plasmatiques et différentes variables après analyse de régression multiple.

Tableau LI : Génotypes de 7 lignées cellulaires pour 3 transporteurs ABC.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABC : *ATP binding-cassette*
ACAT : *Acyl cholesterol acyl transferase*
ADN : Acide désoxyribonucléique
AHR : *Aryl Hydrocarbon Receptor*
APO : Apolipoprotéine
ARNm : Acide ribonucléique messenger
CAR : *Constitutive androstane receptor*
CMP : Centre de médecine préventive
CO : Contraceptifs oraux
CYPs : Cytochromes P450
DL ou D' : Déséquilibre de liaison
dNTP : desoxyribonucleotides triphosphates
EMXT : Enzymes du métabolisme des xénobiotiques et transporteurs
FT : Facteur de transcription
GB : Globules blancs
GGT : Gamma glutamyl transferase
GR : *Glucocorticoid receptor*
GSTs : Glutathion-S-transférases
HDL : *High density lipoprotein*
HMG CoA : 3-hydroxy- 3-méthylglutaryl coenzyme A
HTA : Hypertension artérielle
IMC : Indice de masse corporelle
LDL : *Low density lipoprotein*
MDR1 : *Multidrug resistance 1*
NATs : N-acétyltransférases
NBD : Domaine de liaison aux nucléotides
PAD : Pression artérielle diastolique
PAS : Pression artérielle systolique
pb : Paires de bases
PBMCs : Cellules mononuclées issues du sang périphérique
PCR-RFLP : *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*
P-gp : P-glycoprotéine
PPAR : *peroxisome proliferator activated receptor*
PXR : *Pregnane X receptor*
RT-PCR : *Reverse transcription - polymerase chain reaction*
SNP : *Single nucleotide polymorphism*
SVF : Sérum de veau foetal
THS : Traitement hormonal substitutif
TG : Triglycérides
TGO : Transaminase glutamique oxalo-acétique
TGP : Transaminase glutamique pyruvique
TMD : Domaine transmembranaire
UGTs : UDP-glucuronyltransférases

TABLE DES MATIERES

HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS	13
SITUATION DU SUJET	17
I. Physiopathologie et pharmacologie cardiovasculaires.....	18
A. Maladies cardiovasculaires	18
B. Médicaments à visée cardiovasculaire	22
C. Métabolisme lipidique.....	28
D. Intérêt d'une approche pharmacogénomique en médecine personnalisée	36
II. Métabolisme et transport des substrats médicamenteux ou non médicamenteux	38
A. Généralités sur le métabolisme et le transport des substrats médicamenteux ou non médicamenteux.....	38
B. Transporteurs ABC	45
III. Transporteur ABCB1	52
A. Localisations et structure.....	52
B. Rôles et substrats	54
C. Polymorphismes du gène <i>ABCB1</i>	55
D. Régulation de l'expression du gène <i>ABCB1</i>	65
E. Transporteur ABCB1 et métabolisme lipidique.....	72
IV. Modèle d'étude : le tissu hématopoïétique.....	78
MATERIEL ET METHODES	82
I. Populations étudiées.....	83
A. Cohorte STANISLAS	83
B. Population de l'étude HYDROGENE.....	84
II. Paramètres cliniques et biologiques	85
A. Données cliniques	85
B. Dosages biologiques.....	86
III. Analyses génétiques	86
A. Extraction de l'ADN génomique.....	86
B. Techniques de génotypage	88
IV. Analyses transcriptomiques.....	108
A. Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique	108
B. Extraction des ARN totaux	108
C. Puces d'expression	109
D. Quantification par RT-PCR en temps réel	109
V. Culture cellulaire et lignées.....	114
A. Préparation des milieux de culture	114
B. Décongélation d'une lignée cellulaire.....	114
C. Numération cellulaire	114
D. Repiquage.....	115

VI.	Etudes statistiques	116
A.	Etudes d'associations génotypes-phénotypes.....	116
B.	Etudes familiales	118
C.	Puces d'expression	119
D.	Etudes d'expression par RT-PCR quantitative en temps réel	119
RESULTATS ET DISCUSSION		120
I.	Analyse génomique du transporteur ABCB1 et lipides chez des sujets sains de la cohorte STANISLAS	122
A.	Caractéristiques de l'échantillon étudié	122
B.	Analyse des variants du gène <i>ABCB1</i>	123
C.	Associations des variants d' <i>ABCB1</i> aux taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques	130
D.	Association des variants d' <i>ABCA1</i> et d' <i>ABCG8</i> aux taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines	142
E.	Part des polymorphismes d' <i>ABCB1</i> dans la variabilité des lipides et des apolipoprotéines : corrélations familiales	149
II.	Analyse génomique du transporteur ABCB1 et lipides chez les sujets de l'étude HYDROGENE	154
A.	Caractéristiques de la population HYDROGENE	155
B.	Etude des fréquences des polymorphismes d' <i>ABCB1</i>	156
C.	Associations des polymorphismes d' <i>ABCB1</i> aux taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques	158
III.	Analyse transcriptomique de transporteurs, d'enzymes du métabolisme des médicaments et de facteurs de transcription dans les PBMCs de sujets de la cohorte STANISLAS	164
A.	Analyse de l'expression d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de facteurs de transcription par puce à ADN	164
B.	Analyse quantitative de l'expression d' <i>ABCB1</i> et de PXR par RT-PCR en temps réel	174
C.	Etude des corrélations entre expressions d' <i>ABCB1</i> et PXR dans les PBMCs et taux de lipides plasmatiques.....	202
IV.	Polymorphismes D' <i>ABCB1</i> et d'autres gènes impliqués en physiopathologie cardiovasculaire dans 7 lignées cellulaires continues	210
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		214
REFERENCES		225

HYPOTHESES DE TRAVAIL & OBJECTIFS

HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies complexes, multifactorielles et d'importance majeure en santé publique. En effet, ces affections occupent une place prépondérante dans la morbidité et la mortalité dans le monde et les traitements médicamenteux associés représentent une part importante des dépenses de santé.

Avec l'âge, le tabagisme, l'hypertension artérielle et le diabète, les dyslipidémies font partie des principaux facteurs de risque cardiovasculaire. Il est bien établi que des concentrations plasmatiques élevées en cholestérol total, en LDL cholestérol (LDL), en Apolipoprotéine B (ApoB), en triglycérides (TG) ou des concentrations faibles en HDL cholestérol (HDL) et en Apolipoprotéine A1 (ApoA1) sont des facteurs pro-athérogènes prédictifs du risque cardiovasculaire.

De nombreuses voies biologiques participent à la régulation de l'homéostasie des lipides. La famille des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) regroupe une cinquantaine de protéines qui assurent le transport membranaire d'une grande variété de substrats, physiologiques ou non. Ils participent à de multiples fonctions dont le transport de lipides et certains sont considérés comme des cibles potentielles de traitements à visée hypolipémiante. Ainsi, le transporteur ABCA1 est responsable du transport inverse du cholestérol des cellules périphériques vers le foie. Des défauts d'expression de ce transporteur sont associés à des dyslipidémies familiales comme la maladie de Tangier. Les transporteurs hétérodimères ABCG5/G8 sont eux associés à une limitation de l'absorption des stérols au niveau intestinal et favorisent l'excrétion de ces stérols au niveau biliaire. Des anomalies de ces transporteurs sont associées à la sitostérolémie.

Le transporteur ABCB1, ou P-glycoprotéine, est codé par le gène polymorphe *ABCB1* mieux connu sous le nom de multidrug resistance 1 (*MDR1*). C'est une pompe d'efflux qui exporte des substrats lipophiles du compartiment intracellulaire vers le compartiment extracellulaire. ABCB1 est exprimé au niveau de l'intestin et du foie principalement, mais également dans le cœur, dans le système nerveux central et les cellules mononuclées du sang périphérique. Ce transporteur possède une grande variété de substrats exogènes ou endogènes. Il transporte de nombreux médicaments dont des anticancéreux, immunosuppresseurs, antirétroviraux, ou hypolipémiants. Il est admis que de nombreux phénomènes de résistance à des traitements

médicamenteux sont associés à des variations de l'expression de ce transporteur. Ces variations d'expression peuvent être liées notamment à des polymorphismes mais aussi à des phénomènes d'induction/inhibition via le facteur de transcription PXR (*Pregnane X Receptor*). L'implication d'ABCB1 au niveau physiologique est moins connue. ABCB1 a des substrats physiologiques comme les phospholipides, des hormones stéroïdiennes et des cytokines. ABCB1 pourrait également être impliqué dans le métabolisme du cholestérol et dans le développement des pathologies cardiovasculaires. En effet, comme une grande partie des transporteurs ABC, *ABCB1* est un gène répondant au cholestérol. De plus, ABCB1 est exprimé dans des microdomaines membranaires particulièrement riches en cholestérol. Des expériences *in vitro* et *ex vivo* ont montrées qu'ABCB1 pourrait faciliter la redistribution du cholestérol libre de la couche interne vers la couche externe de la bicouche lipidique ou vers le réticulum endoplasmique, favorisant ainsi son estérification. Enfin, ABCB1 pourrait réguler la réabsorption intestinale du cholestérol et favoriser l'athérosclérose.

Les cellules mononuclées issues du sang périphérique (PBMCs) sont des cellules facilement accessibles, formant un tissu plutôt homogène, dite « sentinelles » et jouant un rôle en physiopathologie cardiovasculaire. Elles ont été utilisées avec succès pour l'étude du transcriptome associé au métabolisme lipidique. De plus, elles expriment nombre de facteurs de transcription, d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de transporteurs. Bien que l'expression dans les cellules mononuclées issues du sang périphérique soit faible en comparaison avec des tissus comme le foie, les PBMCs restent d'intérêt pour mesurer et étudier l'expression de ces protéines et de leurs facteurs de transcription.

Le transporteur ABCB1 interviendrait dans l'homéostasie des lipides, il est codé par un gène très polymorphe et est exprimé dans les PBMCs. Cela nous a conduit à nous intéresser dans ce travail à ABCB1 comme éventuel marqueur cardiovasculaire. Notre objectif est donc de réaliser une analyse génomique et transcriptomique du transporteur ABCB1 en physiopathologie cardiovasculaire, basée sur les hypothèses suivantes : i) les polymorphismes d'*ABCB1* expliqueraient une partie de la variabilité, attribuable à la génétique, des taux plasmatiques de substrats physiologiques dont des lipides et des lipoprotéines, ii) les PBMCs seraient un modèle d'étude du transport des médicaments par ABCB1, iii) le profil d'expression d'ABCB1 dans les cellules mononuclées du sang périphérique pourrait

constituer un phénotype facilement mesurable et devenir un nouveau biomarqueur cardiovasculaire comme les cytochromes CYP2C19 ou CYP2J2.

Dans une première partie, nous nous consacrerons à l'analyse génétique du transporteur ABCB1. Nous sélectionnerons les polymorphismes potentiellement intéressants et étudierons leur fréquence dans un échantillon supposé sain de la cohorte STANISLAS. Nous réaliserons des études d'association entre les différents génotypes observés et les taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques. Nous estimerons ensuite la part du transporteur ABCB1 dans la variabilité de ces lipides. Enfin, nous étudierons l'effet des génotypes les plus fréquents d'*ABCB1* sur les lipides dans une population d'hypertendus-diabétiques, donc à risque cardiovasculaire élevé, de l'étude HYDROGENE.

Dans une seconde partie, nous effectuerons dans les PBMCs une analyse transcriptomique d'enzymes du métabolisme des médicaments, de transporteurs et des facteurs de transcription associés. Nous nous attacherons à étudier, grâce à une puce à ADNc, l'expression d'un grand nombre d'enzymes du métabolisme des médicaments et de facteurs de transcription afin d'évaluer si les PBMCs seraient un tissu d'intérêt pour étudier l'expression de ces gènes en physiopathologie cardiovasculaire. Nous étudierons ensuite l'expression quantitative de l'ARN messager (ARNm) d'*ABCB1* et de *PXR*, dans les PBMCs de sujets sains de la cohorte STANISLAS. Nous chercherons les facteurs de variabilité interindividuelle de l'expression d'*ABCB1* et de *PXR*. Nous corrélons ensuite l'expression d'*ABCB1* et l'expression de *PXR*. Finalement, nous nous intéresserons aux associations entre ARNm d'*ABCB1* et taux de lipides plasmatiques afin de montrer si l'expression d'*ABCB1* dans les PBMCs serait un marqueur intéressant du risque cardiovasculaire.

SITUATION DU SUJET

SITUATION DU SUJET

Nous commencerons par des généralités sur la physiopathologie cardiovasculaire, le métabolisme lipidique et sur les médicaments associés au système cardiovasculaire, y compris les médicaments hypolipémiants. Nous présenterons ensuite les enzymes et les transporteurs associés au métabolisme et au transport des xéno et endobiotes, en nous focalisant sur les transporteurs ABC liés au métabolisme des lipides. Nous détaillerons le transporteur ABCB1, les polymorphismes et la régulation de son gène, et son rôle potentiel dans le transport des lipides. Enfin, nous détaillerons le choix du modèle tissulaire retenu pour notre étude transcriptomique d'ACB1, les cellules mononuclées du sang périphérique.

I. Physiopathologie et pharmacologie cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies complexes, multifactorielles et d'importance majeure en santé publique. De nombreuses classes médicamenteuses sont associées aux traitements de ces pathologies ou de leurs facteurs de risque. Or, il existe une grande variabilité interindividuelle de la susceptibilité à ces pathologies ou de la réponse à ces médicaments.

A. Maladies cardiovasculaires

1) Définition et épidémiologie

Sous la terminologie de «maladies cardiovasculaires», la littérature fait référence à différentes atteintes du système circulatoire (cœur et vaisseaux) qui ont fréquemment en commun une physiopathologie liée à l'athérosclérose infraclinique [1]. Il peut s'agir de :

- maladies coronariennes (angor d'effort, angor instable, infarctus du myocarde),
- accidents vasculaires cérébraux (hémorragiques ou ischémiques, transitoires ou constitués),
- pathologies vasculaires périphériques (artériopathie oblitérante des membres inférieurs, anévrisme aortique, insuffisance rénale par néphro-angiosclérose),
- insuffisance cardiaque.

Les affections cardiovasculaires occupent une place prépondérante dans la morbidité et la mortalité. Elles sont parmi les deux premières causes de mortalité dans le monde avec le cancer. En France, 32% des décès enregistrés en 2003 étaient liés à une pathologie cardiovasculaire : 27% par cardiopathie ischémique, 25% par accident vasculaire cérébral, 23% par insuffisance cardiaque et 25% par les autres pathologies vasculaires [1]. Même si la mortalité due à ces affections diminue depuis une vingtaine d'années grâce aux progrès de la médecine, elles restent de première importance en santé publique. Ainsi, la morbidité déclarée liée aux maladies cardiovasculaires a été multipliée par trois en 20 ans. En 2001 en France, les prises en charge en affection de longue durée des maladies cardiovasculaires concernaient 31% des hommes et 17% des femmes âgés de 25 à 64 ans. Au-delà de 65 ans, 35% des causes de décès, 16% des hospitalisations, 41% des admissions en affection de longue durée et 71% des causes de morbidité déclarée étaient liées à une maladie cardiovasculaire [1].

De nombreuses études, telle l'étude MONICA, ont montré qu'il existe en Europe un gradient Nord-Sud du risque cardiovasculaire, l'incidence et la prévalence des maladies cardiovasculaires étant plus élevées dans les pays du Nord que dans ceux du Sud [2]. Certains polymorphismes génétiques associés à ces maladies présentent également une variabilité géographique. Ainsi, la distribution de l'allèle $\epsilon 4$ de l'*ApoE*, associé à une augmentation du risque de maladie coronarienne, suit le gradient Nord-Sud des pathologies cardiovasculaires avec par exemple une fréquence au moins 2 fois plus élevée en Finlande qu'en Grèce [3]. A cet aspect génétique se superposent les facteurs de l'environnement, en particulier l'alimentation, très différente dans les pays nordiques et méditerranéens. De même, il existe en France des disparités régionales. La Lorraine est ainsi une région particulièrement à risque pour ces pathologies. Dans cette région, la mortalité par affections cardiovasculaires (notamment par cardiopathies ischémiques et par accidents vasculaires cérébraux) est significativement supérieure à la moyenne nationale (surmortalité de 17% sur la période 2000-2002), chez les hommes comme chez les femmes, et à âge identique [4].

2) Facteurs de risque

Un facteur de risque cardiovasculaire peut être défini comme un état clinique ou biologique qui augmente le risque de survenue d'un événement cardiovasculaire donné. Pour qu'un critère soit retenu comme facteur de risque, il faut que son association avec la pathologie soit statistiquement forte, graduelle et cohérente dans le temps, observée de manière similaire dans

l'ensemble des études épidémiologiques et dans des populations différentes. Cette association persiste lorsque les autres facteurs de risque sont pris en compte. Des centaines de variables ont été statistiquement associées à ces pathologies [5]. Ces facteurs interagissent entre eux chez un individu donné pour déterminer le risque de survenue de ces maladies.

Deux types de facteurs de risque interviennent dans les maladies cardiovasculaires. Il y a d'une part des facteurs non modifiables comme l'âge, le sexe ou l'hérédité. Et d'autre part, il existe des facteurs modifiables, c'est-à-dire qu'il est possible d'agir sur leur niveau, ce qui les rend accessibles à des actions de prévention. Ce sont par exemple l'hypertension artérielle, la dyslipidémie, le diabète et l'obésité. Les facteurs environnementaux tels que le tabac et la sédentarité, le stress et l'alcool en font également partie. Les recommandations européennes et américaines classent les facteurs de risque cardiovasculaire en 3 groupes selon leur degré d'imputabilité : majeurs, prédisposants ou discutés (Tableau I).

Tableau I : Différents facteurs de risque cardiovasculaires identifiés [1].

Lien de causalité	Facteur de risque identifié	Impact du facteur de risque
Facteurs de risque majeurs	<ul style="list-style-type: none"> - Tabagisme - Hypertension artérielle - Élévation du cholestérol total - Élévation du LDL-cholestérol - Diminution du HDL-cholestérol - Diabète de type 2 - Âge 	- Effet multiplicateur du risque cardio-vasculaire indépendamment des autres facteurs de risque
Facteurs de risque prédisposants	<ul style="list-style-type: none"> - Obésité androïde - Sédentarité - Antécédents familiaux de maladie coronarienne précoce (H < 55 ans, F < 65 ans) - Origine géographique - Précarité - Ménopause 	- Effet potentialisateur lorsqu'ils sont associés aux facteurs de risque majeurs
Facteurs de risque discutés	<ul style="list-style-type: none"> - Élévation des triglycérides - Lipoprotéines LDL petites et denses - Élévation de l'homocystéine - Élévation de la lipoprotéine A - Facteurs prothrombotiques (fibrinogène, inhibiteur de l'activateur du plasminogène) - Marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) - Facteurs génétiques - Facteurs infectieux (<i>Chlamydia pneumoniae</i>, <i>Helicobacter pylori</i>, cytomégalovirus) 	- Associé à un risque augmenté de maladie cardio-vasculaire (coronarienne et/ou vasculaire cérébrale) mais le degré d'imputabilité est méconnu

(H) = homme ; F = femme ; CRP = C reactive protein ; IL-6 = interleukine 6 ; LDL = low density lipoproteins cholesterol .

Ainsi, l'âge, l'hypertension artérielle, les dyslipidémies et le diabète ont été identifiés, avec le tabagisme, comme les principaux facteurs de risque cardiovasculaire. L'obésité, la sédentarité, les facteurs psychosociaux comme la précarité mais aussi l'origine géographique et le statut hormonal chez la femme sont considérés comme des facteurs de risque prédisposants et doivent être pris en compte dans une démarche de prévention primaire de l'hypertension artérielle, du diabète et des dyslipidémies. Cependant, ces facteurs ne suffisent pas toujours à expliquer ces pathologies. D'autres facteurs de risque sont discutés comme les facteurs thrombogéniques, les marqueurs de l'inflammation ou les facteurs génétiques. La prise en compte des facteurs génétiques et/ou d'interactions gènes-environnement peut ainsi permettre de découvrir de nouveaux facteurs de risque. Certaines pathologies cardiovasculaires, comme les hypercholestérolémies familiales, sont d'origine monogénique et ont été facilement identifiées par l'étude de quelques familles porteuses. Mais la plupart de ces pathologies sont complexes et de multiples facteurs génétiques et environnementaux contribuent à leur développement et à leur progression dans la population générale. L'un des challenges consiste à identifier les polymorphismes génétiques fréquents qui indépendamment peuvent ne conférer qu'un risque modeste mais qui, collectivement, peuvent donner un profil à haut risque.

De nombreux facteurs de risque environnementaux et génétiques contribuent au développement des maladies cardiovasculaires [6]. Cet aspect multifactoriel rend difficile l'étude interindividuelle de la susceptibilité à ces pathologies. De nombreuses voies biologiques sont susceptibles de contribuer au développement et à la progression des maladies cardiovasculaires, et notamment au processus athérosclérotique, dont les voies de l'inflammation, de l'adhésion cellulaire, du système immunitaire, de la croissance cellulaire, du métabolisme des lipides et des lipoprotéines, de la régulation de la pression artérielle, de la coagulation ou encore du stress oxydant. La régulation de l'homéostasie des lipides est particulièrement intéressante puisque des concentrations plasmatiques élevées en cholestérol total, en cholestérol-LDL (*Low Density Lipoprotein*), en apolipoprotéine B, en triglycérides ou des concentrations faibles en cholestérol-HDL (*High Density Lipoprotein*) et en apolipoprotéine A1 sont des facteurs pro-athérogènes prédictifs du risque cardiovasculaire et puisque la connaissance du profil lipidique peut prédire les personnes à risque avant l'apparition de la pathologie [7].

B. Médicaments à visée cardiovasculaire

1) Généralités

La consommation de médicaments est un outil d'étude à part entière qui reflète l'état de santé d'une population, comme un indice d'évolution de la morbidité, ou comme un indice d'évaluation de mesures de prévention ou de traitement d'une population. Compte tenu 1) de l'importance des pathologies cardiovasculaires dans la morbidité et la mortalité des Français et plus particulièrement des Lorrains et 2) du nombre élevé de classes médicamenteuses à visée cardiovasculaire et de leur coût en santé publique, nous nous étions intéressés au cours de nos travaux de DEA à la consommation de ces thérapeutiques.

Les français sont les deuxièmes plus gros consommateurs de médicaments dans le monde derrière les Etats-Unis en prix et probablement les premiers en quantité [8], Quatre français sur 10 consomment au moins un médicament par jour [9]. Les médicaments représentent ainsi le 3^e poste de dépense de santé après les soins hospitaliers et la médecine de ville [10]. Cette consommation augmente avec l'âge et les femmes sont plus consommatrices que les hommes. Les 2 classes médicamenteuses les plus consommées en France sont les médicaments cardiovasculaires et les psychotropes. Les médicaments du système cardiovasculaire occupent le premier rang du marché en valeur et le troisième en unités sur la décennie 1990 [10].

Le Centre de Médecine Préventive (CMP) de Vandoeuvre-lès-Nancy est un centre d'examen de santé dont le but est de définir et d'évaluer l'état de santé de la population à travers un examen de santé familial. La population venant au CMP, proche de la population générale, est essentiellement d'origine lorraine et présente donc l'intérêt d'associer un effectif élevé à de fortes incidences et prévalences des maladies cardiovasculaires. Le CMP dispose d'un questionnaire papier portant sur la consommation médicamenteuse. Ce questionnaire intègre une notion de durée de prise qui permet de s'intéresser soit aux médicaments pris sur une longue durée, soit aux médicaments pris à court terme (c'est-à-dire moins d'un mois) mais ne permet pas de connaître ni le dosage des médicaments ni leur fréquence de prise. Ce questionnaire est un outil intéressant et fiable, qui s'apparente au relevé journalier utilisé par le CREDES qui serait plus fiable qu'un recueil mensuel [9].

Une période d'étude de dix ans permet de déterminer des tendances comme le montrent Cavalier et al., [10] qui jugent suffisante l'observation de onze années consécutives de vente pour dégager et interpréter les tendances du marché pharmaceutique français. Le CMP

possède des données considérables, tant en années qu'en effectifs, qui autorisent ce suivi décennal. Au cours de notre DEA, nous avons donc étudié l'évolution de la consommation de thérapeutiques cardiovasculaires entre 1991 et 2000, en fonction de l'âge et du sexe, dans un échantillon de 71 411 hommes et de 74 921 femmes de 30 à 70 ans. Cela nous a permis de mettre en évidence les variations de la consommation médicamenteuse globale et celles de classes particulières au cours de la décennie et de suivre l'émergence ou la disparition de certaines familles pharmaceutiques. Nous avons montré sur la décennie une augmentation de la consommation médicamenteuse (Tableau II) en accord avec Cavalié et al., [10] qui montrent que le taux de ventes de boîtes en France a augmenté entre 1991 à 2001.

Tableau II : Proportion de consommateurs de médicaments au CMP en 1992 et 2000 (en %).

Classe d'âge (années)	Consommateurs en 1992 (en %)		Consommateurs en 2000 (en %)	
	Hommes	Femmes	Hommes	Femmes
30-44	13,6	43,9	17,4	49,2
45-59	33,8	61,5	39,1	70,4
60-69	58,2	79,6	67,6	86,8

2) Médicaments cardiovasculaires

De nombreuses classes médicamenteuses sont utilisées pour le traitement des pathologies cardiovasculaires et de leurs facteurs de risque. Durant nos travaux de DEA, nous nous étions intéressés à la quasi-totalité des classes thérapeutiques à visée cardiovasculaire soit les classes des antiangoreux, des antihypertenseurs, des antiarythmiques, des cardiotoniques, des vasodilatateurs, des antiagrégants plaquettaires, des diurétiques et des veinotoniques. Nous avons également retenus les classes agissant sur les facteurs de risque dont les hypoglycémiantes, les hypolipémiants, les contraceptifs et les médicaments de la ménopause. Si la consommation globale de médicaments a augmenté, il apparaît que la consommation de médicaments cardiovasculaires est restée stable sur la décennie (Figure 1). Cela concorde avec les résultats de Cavalié et al., [10] qui montrent que les médicaments cardiovasculaires représentent en valeur 27,45% du marché en 1991 et 24,2% en 2001 et en quantité 17,1% en 1991 et 15,1% en 2001. Cela cache en fait de grandes disparités dans cette famille, avec l'augmentation de l'utilisation de certaines classes, notamment celles utilisées pour le traitement des facteurs de risque (antihypertenseurs, hypolipémiants) et la diminution d'autres (vasculoprotecteurs) (Figure 1). De plus, de nouvelles formulations (dosage plus fort, forme à

libération prolongée, association de deux principes actifs) sont apparues faisant baisser la consommation apparente.

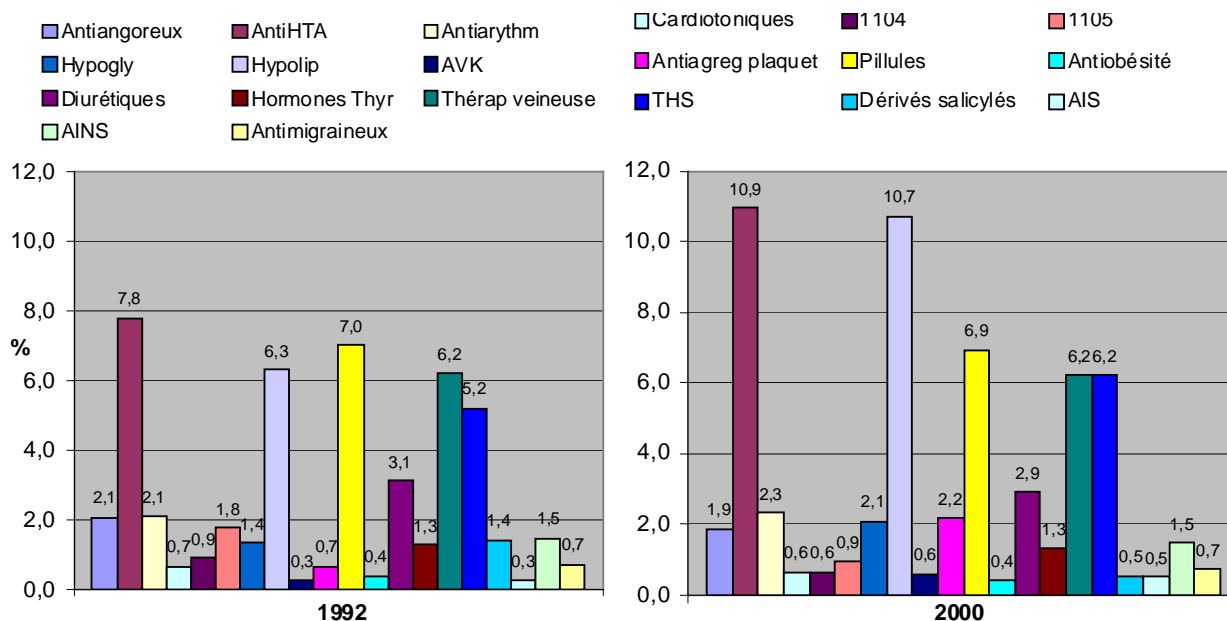


Figure 1 : Comparaison de la consommation de médicaments cardiovasculaires au Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre-lès-Nancy en 1992 et 2000.

Les deux classes du système cardiovasculaire les plus consommés sur la décennie sont les antihypertenseurs (12,5% avec les diurétiques) et les hypolipémiants (8,2%). Les hypolipémiants sont particulièrement intéressants puisqu'ils ont connu un fort développement notamment grâce à l'apparition de nouvelles molécules.

3) Médicaments hypolipémiants

(a) Classes d'hypolipémiants

A l'heure actuelle, trois classes de médicaments sont disponibles : statines, fibrates et résines ; auxquels s'ajoutent trois produits : la niacine, le probucol, et l'ézétimibe. La recherche de nouveaux agents thérapeutiques est fondée sur la modification de l'activité d'une cible moléculaire précise. Pour certaines cibles du métabolisme du cholestérol, des molécules sont en cours de développement préclinique ou clinique (Figure 2).

L'effet hypocholestérolémiant des statines est dû à la diminution de la biosynthèse du cholestérol par inhibition de l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) réductase. Ces molécules médicamenteuses ont de plus des effets anti-athérogènes sur la paroi vasculaire (anti-inflammatoire, stabilisation de la plaque). La combinaison de ces effets est à l'origine de leur efficacité démontrée par des études cliniques: diminution d'environ 30% du nombre d'événements cardiovasculaires et de décès. L'effet principal des fibrates réside dans la diminution du taux des triglycérides plasmatiques. Ce sont des agonistes du PPAR α (*peroxisome proliferator activated receptor α*) conduisant à l'activation de la lipoprotéine lipase et l'augmentation des apolipoprotéines AI et AII, constituants majeurs des HDL. Les résines favorisent une élimination accrue des acides biliaires dans les fèces, ce qui augmente leur synthèse à partir du cholestérol. Enfin, la niacine et le probucol sont peu utilisés, notamment en raison d'une mauvaise tolérance ou d'une faible efficacité. L'ézétimibe, un produit hypocholestérolémiant récemment commercialisé, est un inhibiteur spécifique de l'absorption intestinale du cholestérol. Il agirait sur le/les transporteur(s) de cholestérol dans les entérocytes. Il s'impose avant tout comme un complément aux statines et permet une réduction supplémentaire de la cholestérolémie de 15-20%.

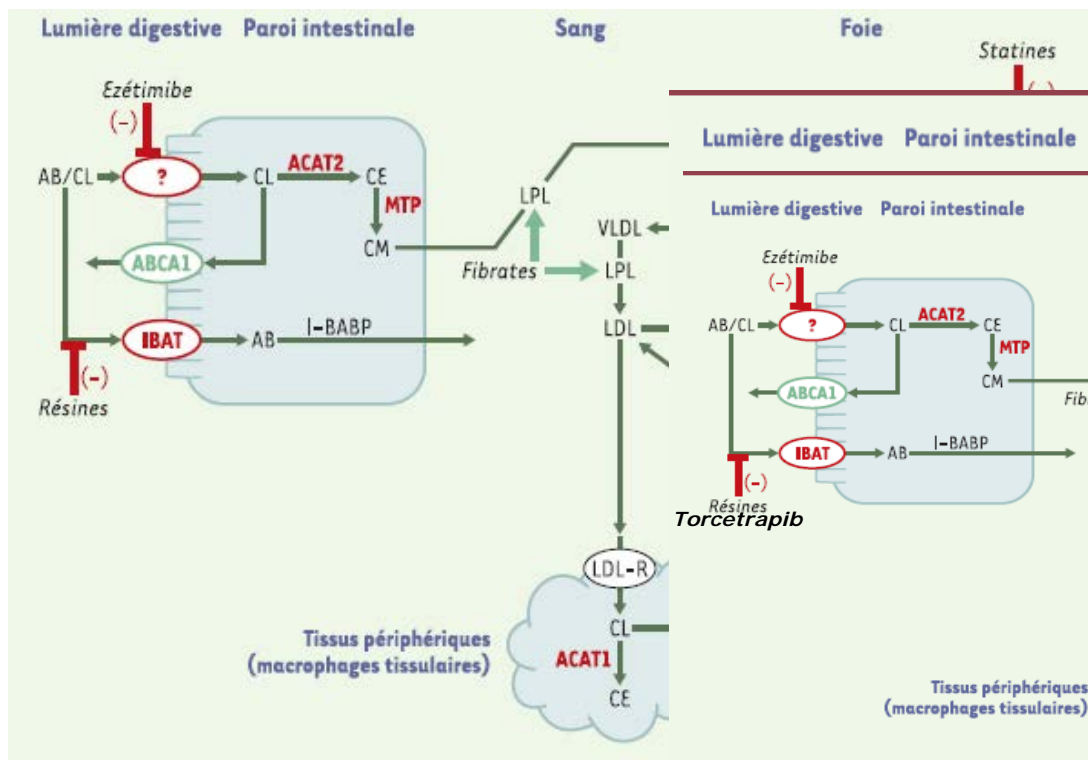


Figure 2 : Métabolisme du cholestérol et cibles moléculaires des médicaments existants ou en développement contre l'athérosclérose. Les cibles moléculaires visées par de nouvelles

molécules sont indiquées en vert (cibles qu'il faudrait activer) ou en rouge (cibles qu'il faudrait inhiber). D'après [11].

(b) Consommation d'hypolipémiants

La période étudiée au cours de notre DEA correspond à la décennie de mise sur le marché des statines. La consommation d'hypolipémiants a doublé sur la décennie avec 10,7% de consommateurs dans notre population en 2000 contre 4,3% en 1991 (Figure 3). Cette évolution de la consommation dans la population lorraine est corrélée avec les chiffres de vente fournis par un grossiste-répartiteur lorrain (CERP-Lorraine).

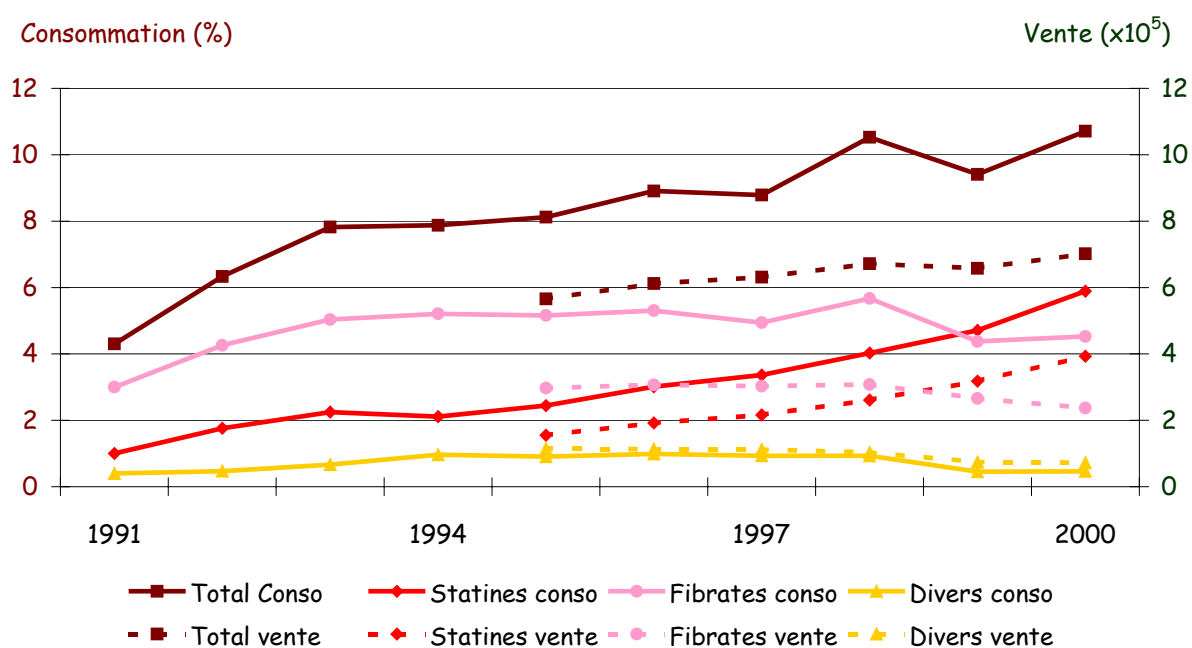


Figure 3 : Evolution annuelle de la consommation d'hypolipémiants au CMP (en %) et des ventes de la CERP-Lorraine entre 1991 et 2000 ($\times 10^5$ boîtes).

A la fin de la décennie étudiée, les recommandations préconisaient en cas d'hypercholestérolémie de préférer les statines aux fibrates ou aux résines, tandis qu'en cas d'hypertriglycéridémie, le traitement de choix passe par un fibrate. En cas d'hyperlipidémie mixte, l'un ou l'autre est choisi en fonction du facteur à réduire en priorité. Les courbes de consommation de fibrates (Figure 4) ont tendance à augmenter sur la première moitié de la décennie, puis atteignent une phase de plateau. Ces courbes décroissent même chez les femmes plus de 60 ans à partir de 1997. A l'inverse, les courbes de consommation de statines (Figure 4), nouvelle classe apparue en 1989, sont significativement croissantes. Nous

La prescription des statines en première ligne a augmenté fortement dès le début de leur mise sur le marché, or comme nous venons de le voir, les principales études montrant leur grand intérêt en prévention primaire ne sont apparues que vers 1998. Cela s'expliquerait par les politiques de marketing. Selon Marquès-Vidal et al., [12] et Mousquès et al., [14], le choix du traitement par le prescripteur se fait en fonction des facteurs médicaux du patient et sont relativement conformes aux recommandations (plutôt statines dans l'hypercholestérolémie et fibrates dans l'hyperlipidémie mixte et dans l'hypertryglycémie et peu d'associations) mais les facteurs environnementaux, comme les visiteurs médicaux, ne sont pas négligeables.

La consommation de médicaments reflète l'état de santé et peut permettre d'étudier l'incidence et la prévalence des maladies cardiovasculaires. Cependant, il ne faut pas oublier que cette consommation dépend du comportement de prescription lui-même influencé par les variations de recommandations et les mesures de santé publique mais également par le marketing des laboratoires pharmaceutiques. Enfin, la France a tendance à consommer plus de produits récents, et donc souvent coûteux, que ses voisins européens. En effet, le système de sécurité sociale y est favorable et les médecins sont très sensibles à l'arrivée de nouvelles molécules pharmaceutiques [15].

C. Métabolisme lipidique

1) Homéostasie des lipides

L'athérosclérose est caractérisée par la formation de plaques d'athérome constituant des sites inflammatoires dans la paroi artérielle avec accumulation de lipides et d'éléments fibreux. L'hypercholestérolémie est l'un des principaux facteurs de risque de la maladie. L'incidence des accidents coronariens est directement liée au taux plasmatique de cholestérol-LDL et inversement liée au taux de cholestérol-HDL. Ainsi, le métabolisme du cholestérol est un élément clé du développement des maladies cardiovasculaires [11]. De nombreuses voies biologiques participent à la régulation de l'homéostasie des lipides et leur dysfonctionnement peut contribuer au développement et à la progression des maladies cardiovasculaires et notamment au processus athérosclérotique.

(a) Rôle du cholestérol

Le cholestérol est l'élément indispensable à la synthèse des membranes biologiques dans toutes les cellules. C'est un composant majeur des membranes cellulaires qui contribue à leur stabilité et au maintien de leurs structures en s'intercalant entre les phospholipides. Le cholestérol est également un précurseur de nombreuses molécules comme la vitamine D₃, les hormones stéroïdes (cortisol, cortisone, et aldostérone), les hormones stéroïdes sexuelles (progestérone, œstrogènes, et testostérone) et les acides biliaires.

(b) Cycle du cholestérol

Le cholestérol peut provenir de l'alimentation, qui est à l'origine d'environ un tiers des apports journaliers, ou de la biosynthèse, responsable de l'apport des deux tiers restants. La seule voie importante d'élimination du cholestérol est sa transformation hépatique en acides biliaires. Le foie excrète le cholestérol et les acides biliaires dans la bile qui est déversée dans la lumière intestinale au moment de la prise alimentaire. La faible fraction non (ré)absorbée d'acides biliaires et de cholestérol est éliminée dans les fèces (Figure 5).

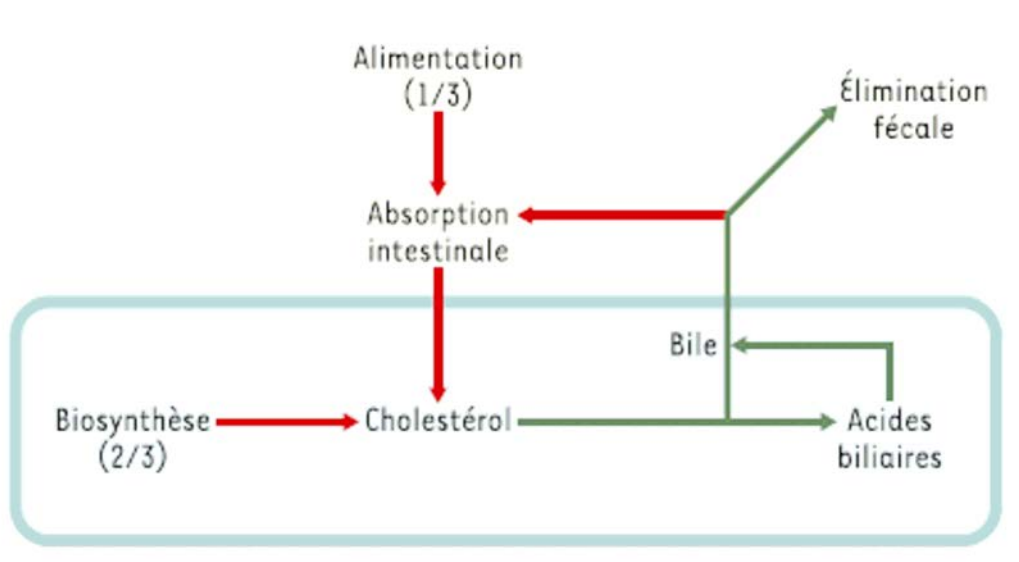


Figure 5 : Voies d'entrée (en rouge) et de sortie (en vert) du cholestérol de l'organisme [11].

(i) Absorption intestinale du cholestérol par l'entérocyte

L'absorption intestinale du cholestérol commence par l'action d'une enzyme pancréatique, la *carboxyl ester lipase* (CEL), qui se lie à la membrane des entérocytes du duodéno-jéjunum. Activée par les acides biliaires, la CEL hydrolyse les esters de cholestérol d'origine alimentaire, libérant ainsi du cholestérol libre et des acides gras absorbables au pôle apical entérocytaire notamment via le transporteur NPC1-L1. Dans les cellules, le cholestérol doit être stocké sous forme estérifiée. Au niveau de leur reticulum endoplasmique, les acides gras et la majorité du cholestérol absorbé sont donc à nouveau estérifiés par l'ACAT2 (*Acyl Cholesterol Acyl Transferase*). Puis ces esters de cholestérol sont assemblés sous l'action de la MTP (*Microsomal Transfer Protein*), avec des triglycérides, des phospholipides et de l'apoB48 au sein des chylomicrons qui seront sécrétés au pôle basolatéral vers le sang (Fig 6). Une petite partie du cholestérol absorbé sort de l'entérocyte au pôle apical via les transporteurs ABCG5 et ABCG8 (*ATP-Binding Cassette G5 et G8*) qui sont responsables de l'exclusion des stérols d'origine végétale et limitent sensiblement l'absorption intestinale du cholestérol lors d'apports alimentaires lipidiques excessifs. Une autre petite partie ressort au pôle basolatéral via ABCA1 vers l'ApoA1 pour former des pré- β HDL. D'autres transporteurs ABC, dont ABCB1, sont exprimés au niveau de la membrane apicale mais leur rôle dans le transport du cholestérol reste mal défini. Cette étape d'absorption est régulée par différents récepteurs nucléaires dont LXR (*Liver X Receptor*) et FXR (*Farnesyl X Receptor*).

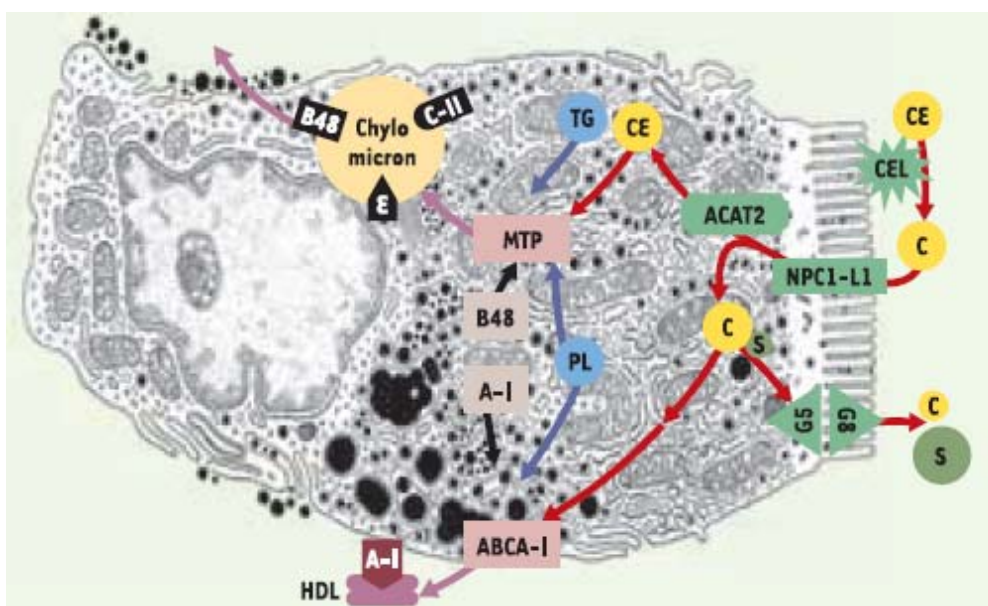


Figure 6 : Absorption intestinale du cholestérol par l'entérocyte [16].

(ii) Bioynthèse du cholestérol

Cette synthèse peut se faire dans toutes les cellules de l'organisme mais se fait principalement dans l'hépatocyte. Elle a lieu dans le cytoplasme, à partir de l'HMG-CoA provenant de la condensation de 3 Acétyl-CoA venant des peroxyosomes. Les acides gras à chaînes courtes, les corps cétoniques et la leucine sont aussi des substrats pour la synthèse du cholestérol. L'étape limitante de cette synthèse du cholestérol, la synthèse de mévalonate, est catalysée par l'enzyme HMG-CoA réductase (étape très régulée par le métabolisme: activité diminuée lorsque d'apport alimentaire élevé en cholestérol ou par des médicaments types statines).

(iii) Transport du cholestérol dans le sang via les lipoprotéines

En tant que composé hydrophobe, le cholestérol n'est pas soluble dans le sang. Son transport est assuré par des lipoprotéines. Ces lipoprotéines contiennent à leur périphérie des apolipoprotéines ; protéines ayant un rôle structural et une fonction métabolique comme la reconnaissance d'un récepteur spécifique ou une activité enzymatique. Il existe 4 types de lipoprotéines :

- Les chylomicrons. Ils transportent les triglycérides de l'intestin vers le foie. Dans le sang, l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) sur ces lipoprotéines permet la libération des acides gras des triglycérides et leur mise en réserve dans le tissu adipeux.

- Les lipoprotéines à très basse densité ou VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*). Les VLDL transportent les triglycérides du foie, où elles sont synthétisées, vers les tissus consommateurs comme les muscles. Dans la circulation elles sont transformées en LDL après hydrolyse par la LPL.

- Les lipoprotéines à basse densité, ou LDL, distribuent le cholestérol à toutes les cellules périphériques qui captent ce cholestérol grâce à leurs récepteurs aux LDL. Des taux importants de LDL conduisent généralement à un dépôt de cholestérol sur les parois des artères. Les récepteurs aux LDL du foie et des tissus sont en effet très sensibles au moindre changement biochimique des LDL, dû par exemple à une oxydation. Les lipoprotéines transportant le cholestérol ne seront plus reconnues par les récepteurs et seront alors phagocytées, puis formeront un dépôt.

- Les lipoprotéines à haute densité, ou HDL, riches en ApoA1 sont responsables du retour du cholestérol tissulaire vers le foie. Elles déchargent les artères et les tissus extrahépatiques du cholestérol excédentaire (rejeté hors de la cellule via ABCA1), et le ramènent vers le foie où il est dégradé. Dans la circulation, les HDL sont remodelées grâce aux différentes enzymes dont la LCAT (*Lecithin Cholesterol Acyltransferase*) et la CETP (*Cholesterol Ester Transfer Protein*). Un des récepteurs via lequel les HDL délivrent le cholestérol au foie est le SR-B1 (*Scavenger Receptor class B type 1*).

(iv) Régulation

Il existe trois niveaux de régulation du cholestérol, le but étant de diminuer le taux de cholestérol de la cellule quand il est en excès :

- Le cholestérol libre dans la cellule inhibe la production de ses propres récepteurs membranaires, les LDLR. Pour ce faire, il inhibe la transcription du gène qui code les LDLR. Par conséquent, le flux entrant de cholestérol dans la cellule est diminué.
- Le cholestérol libre inhibe la HMG-CoA réductase, ce qui empêche la poursuite de la réaction de synthèse du cholestérol.
- Enfin, le cholestérol libre stimule l'ACAT, enzyme catalysant son estérification. Ceci favorise le stockage du cholestérol libre.

(v) Elimination

Le cholestérol est dégradé dans le foie en acides biliaires (dont l'acide chénodésoxycholique) par la 7- α -hydroxylase. Le cholestérol et les acides biliaires sont déversés dans la bile puis éliminés via les fèces.

La figure 7 présente une synthèse des voies métaboliques impliquées dans l'homéostasie lipidique. Pour plus d'informations sur l'homéostasie du cholestérol, voir les revues [16-18].

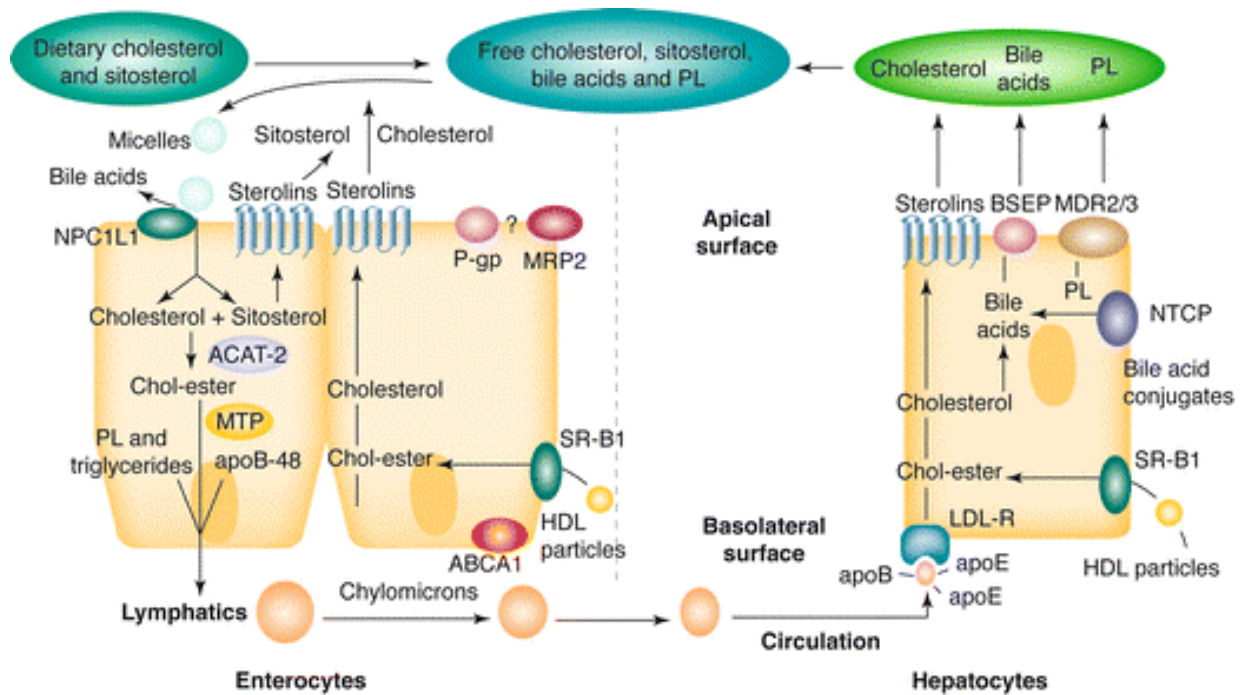


Figure 7 : Voies métaboliques impliquées dans le trafic des stérols alimentaires [18].

2) Athérosclérose

Un déséquilibre dans le cycle du cholestérol peut conduire à un excès de lipides dans le sang qui peut lui-même conduire à un processus athérosclérotique. L'athérosclérose occupe une place majeure dans l'initiation et le développement des maladies cardiovasculaires et de leurs complications cliniques.

En 1954, l'Organisation Mondiale de la Santé a défini l'athérosclérose comme «une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaire; le tout s'accompagnant de modifications de la média». Ce remaniement conduit à la formation d'une plaque athérosclérotique qui peut conduire jusqu'à la thrombose c'est-à-dire à l'obstruction du vaisseau ou à la rupture et migration de la plaque (Figure 8).

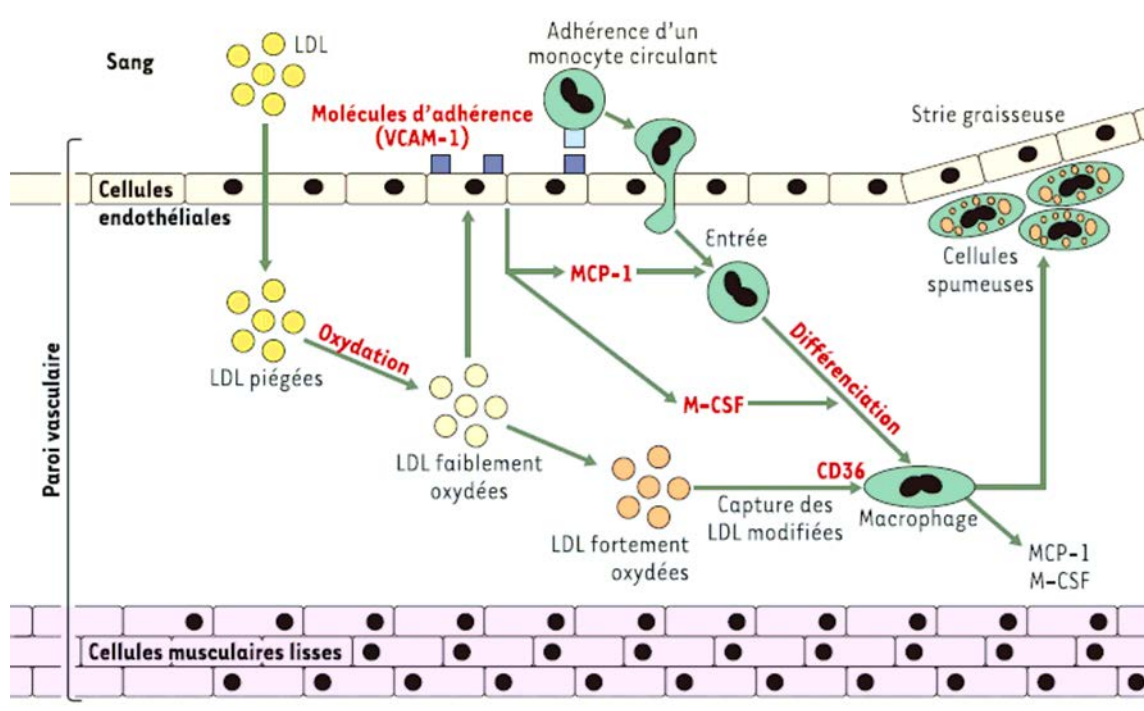


Figure 8 : Evolution de la formation de la plaque athérosclérotique [11].

Les sites privilégiés de formation des lésions sont les embranchements des vaisseaux qui correspondent aux zones de turbulence du courant sanguin. Dans ces zones, les forces hémodynamiques changent les propriétés de l'endothélium en augmentant notamment sa perméabilité aux LDL circulantes. Les LDL diffusent dans la paroi vasculaire où elles se trouvent piégées dans le réseau de fibres et subissent des modifications oxydatives. Les LDL faiblement oxydées ainsi formées ont des propriétés pro-inflammatoires: elles induisent dans les cellules endothéliales la production de molécules d'adhérence (VCAM-1: *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), de facteurs chimio-attractants (MCP1: *Monocyte Chemoattractant Protein 1*) et de facteurs de différenciation (M-CSF: *Macrophage Colony Stimulating Factor-1*). Cela entraîne l'adhésion de monocytes circulants à la paroi vasculaire puis leur entrée dans l'endothélium et leur différenciation en macrophages résidents. La production de MCP1 et de M-CSF par ces macrophages maintient un état d'inflammation chronique dans la lésion. Les LDL continuent à subir des modifications et sont transformées en LDL fortement oxydées qui sont reconnues par les récepteurs «éboueurs» (*scavengers*) des macrophages, dont le CD36. La capture des LDL oxydées par ces récepteurs n'étant pas contrôlée, les macrophages accumulent des lipides et se transforment en cellules spumeuses. Ces cellules s'agglomèrent dans l'intima et sont à l'origine de la lésion précoce du type strie graisseuse (plaque d'athérome), élément clé du processus d'athérogenèse. La lésion peut ensuite évoluer vers une

plaque fibreuse par addition notamment de cellules musculaires lisses puis de plaquettes. Cette plaque va réduire le diamètre du vaisseau et peut se rompre pour aboutir à la formation d'un thrombus occluant la lumière du vaisseau sanguin et provoquant des accidents vasculaires.

3) Gènes d'intérêt liés au métabolisme lipidique

Comme nous l'avons vu dans les 2 précédents chapitres, de nombreuses protéines, donc de nombreux gènes, participent à l'homéostasie des lipides, tels que :

- les gènes codant les protéines de transport du cholestérol au niveau des membranes (ABCA1, IBAT) ou dans le sang (apoprotéines),
- les gènes codants des protéines impliquées dans la synthèse du cholestérol (HMGCoA réductase,), dans sa transformation (ACAT, estérification ; MTP, intégration aux lipoprotéines ; 7- α hydroxylase, transformation en acides biliaires) ou associées au métabolisme des triglycérides (LPL) ou des lipoprotéines (LCAT, CETP),
- les gènes codant les récepteurs aux lipoprotéines permettant l'internalisation du cholestérol dans les cellules (LDLR, SR-B1).

La plupart de ces gènes sont polymorphes et nombre de polymorphismes ont été associés à la variabilité interindividuelle de la susceptibilité à certaines pathologies cardiovasculaires ou à la réponse à leur traitement. Cependant, certains gènes d'intérêt n'ont pas encore été mis en évidence à l'heure actuelle.

D. Intérêt d'une approche pharmacogénomique en médecine personnalisée (Revue N°1 et 2)

La médecine personnalisée est un concept visant à adapter le traitement d'une pathologie à chaque individu grâce à une meilleure connaissance des causes de variabilités interindividuelles. Cela concerne notamment l'individualisation du traitement médicamenteux en fonction du bagage génétique de l'individu (pharmacogénomique) mais également des produits (peptides, protéines et métabolites) de ces gènes (transcriptomique, protéomique et métabolomique). Les biomarqueurs produits de ces gènes peuvent être des métabolites résultant de l'activité des enzymes métabolisant les médicaments, des cibles pharmacodynamiques ou encore des peptides liés au processus inflammatoire.

Afin d'identifier les gènes, ainsi que leurs produits, impliqués dans la réponse différentielle aux médicaments à visée cardiovasculaire nous avons récemment proposé une approche de pharmacogénomique (Figure 9) [19]; applicable à la transcriptomique et à la protéomique [20]; qui propose de considérer successivement 5 étapes pour tout développement de médicament à visée cardiovasculaire :

- les gènes et phénotypes liés à leur pharmacocinétique (absorption, distribution, métabolisme, et élimination) ;
- les gènes et produits (cibles thérapeutiques) liés à leur pharmacodynamie;
- les maladies et risques cardiovasculaires vus sous l'angle des cycles métaboliques spécifiquement en cause;
- la variabilité de l'expression des gènes incluant leur régulation physiologique ;
- les interactions gènes- environnement.

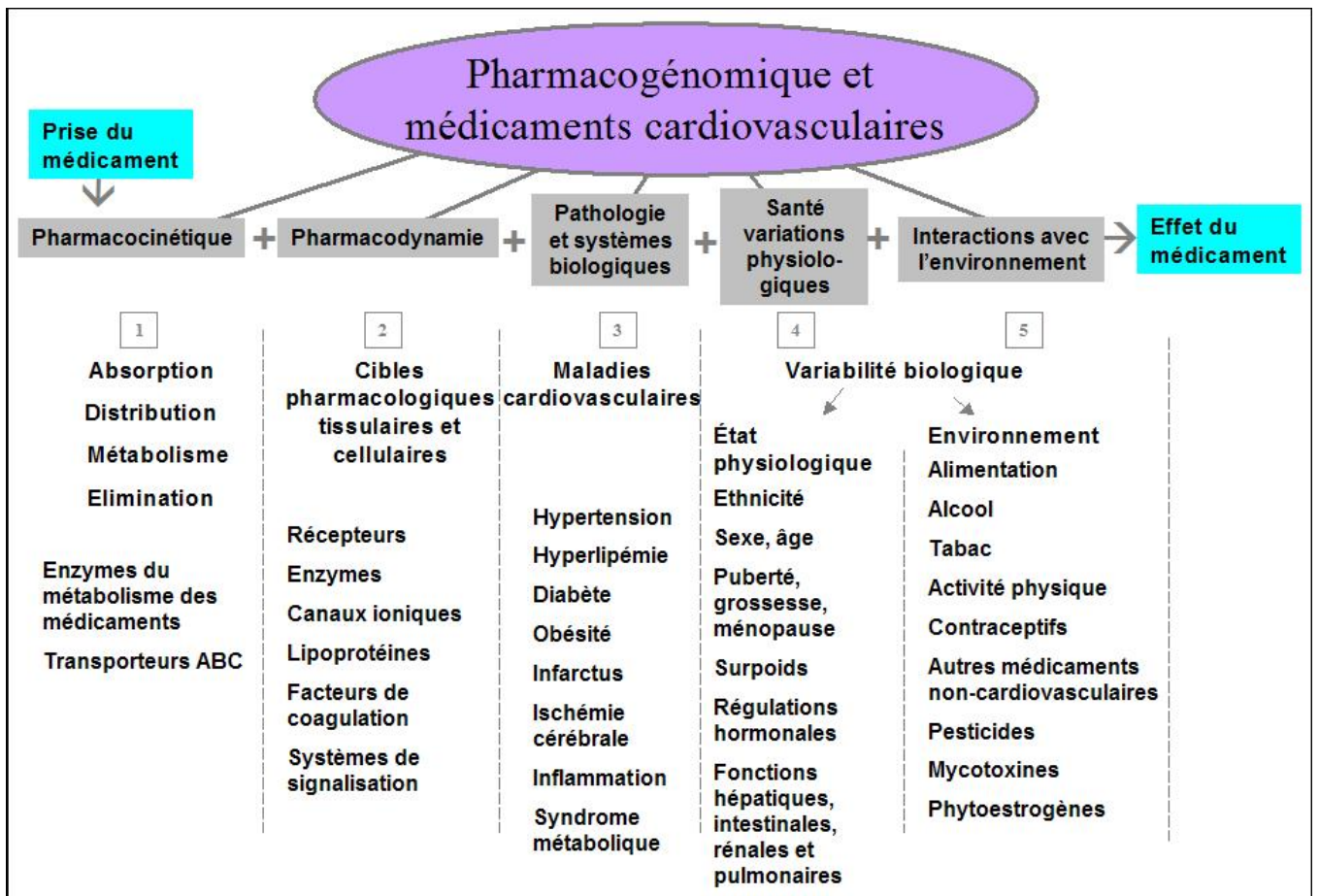


Figure 9 : Approche en 5 étapes de l'individualisation du traitement médicamenteux des pathologies cardiovasculaires [19].

A chacune des cinq étapes de cette stratégie, un nombre important de données peut-être obtenu, rendant nécessaire une interprétation intégrée des variations de l'ADN (Acide DesoxyriboNucléique), de l'ARNm (Acide RiboNucléique messager) et des protéines, au niveau individuel et au niveau de la population générale, pour espérer d'une façon cliniquement simple, adapter un médicament à chaque individu.

II. Métabolisme et transport des substrats médicamenteux ou non médicamenteux

A. Généralités sur le métabolisme et le transport des substrats médicamenteux ou non médicamenteux

Nous sommes exposés quotidiennement à un ensemble de composés environnementaux exogènes rassemblés sous le terme de xénobiotiques ou xénobiotés. Ces composés regroupent des produits naturels, des médicaments et des polluants de l'environnement. Ces molécules sont généralement hydrophobes et tendent à s'accumuler dans les phases lipidiques des membranes cellulaires. Un processus naturel de détoxification permet à l'organisme de limiter l'accumulation de ces xénobiotiques. Ce processus se décompose en 4 phases : l'absorption, la distribution, le métabolisme puis l'élimination (Figure 10). De nombreuses substances physiologiques subissent également les phases de distribution, métabolisme et excrétion via les mêmes enzymes/transporteurs [20].

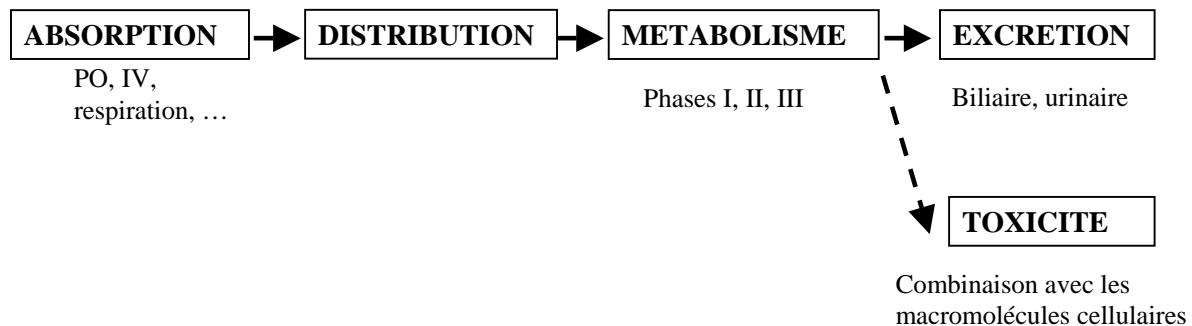


Figure 10 : Les différentes phases du processus de détoxification.

La phase de métabolisme, ou de biotransformation, est elle-même constituée de trois phases (Figure 11) :

- Les réactions de phases I, dites de fonctionnalisation, correspondent à des oxydations, hydrolyses ou réductions et permettent l'introduction d'une molécule chimique rendant le substrat plus polaire.
- Les enzymes de phase II procèdent ensuite à des réactions de conjugaison, permettent l'ajout d'un radical hydrophile soit directement sur le xénobiotique inchangé soit sur les métabolites

généérés par la phase I. Ces réactions de conjugaison réduisent la toxicité du composé et augmentent sa solubilité.

- Enfin, les protéines de phase III, ou transporteurs membranaires, prennent en charge les composés primitifs ou conjugués pour les éliminer hors de la cellule. Ils peuvent se situer sur la face apicale ou basolatérale de la cellule et ainsi éliminer les composés dans le sang, dans la lumière intestinale, dans la bile ou dans l'urine. Cette excréation permet ainsi une élimination rénale, fécale ou un cycle entéro-hépatique.

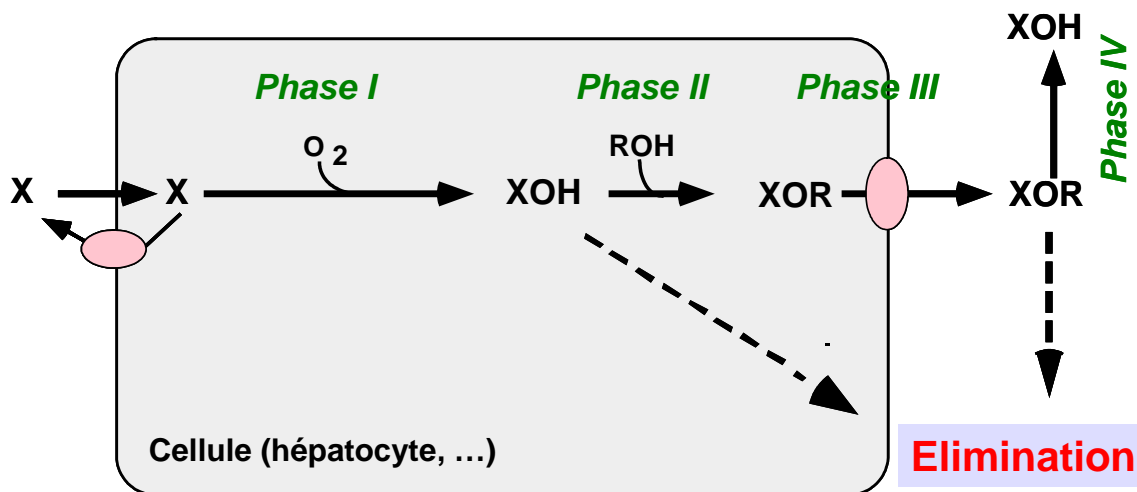


Figure 11 : Les différentes phases du métabolisme et du transport des xénobiotiques.

Chacune des 3 phases implique différentes familles d'enzymes ou de protéines (Tableau III) regroupées de façon large sous le terme « d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et transporteurs » ou EMXT.

Tableau III : Principales enzymes et transporteurs du métabolisme des xéno/endobiotes [21].

PHASE I	PHASE II	PHASE III
Cytochromes P-450 (CYPs)	UDP-glucuronyltransférases (UGTs)	Transporteurs ABC (ABCs)
Alcool deshydrogénases (ADHs)	Glutathion-S-transférases (GSTs)	Transporteurs de cations organiques (OCTs, OCTNs)
Aldéhyde deshydrogénases (ALDHs)	Sulfotransférases (STs)	Transporteurs d'anions organiques (OATs, OATPs)
Monoamine oxydases	N-Acétyltransférases (NATs)	Transporteurs de monocarboxylates (MCTs)
Flavine monooxygénases (FMO)	Méthyltransférases	Transporteurs de peptides (PEPTs)
Reductases	Amino-acyl-transférases	Transporteurs de nucléosides (CNTs)
Estérases	Epoxyde hydrolase	
Dihydropyrimidine Dehydrogénase (DPD)	Histamine Méthyltransférase (HMT)	
NADPH quinone oxidoreductase (NQO1)	Catéchol O Méthyltransférase (COMT)	
	Thiopurine Méthyltransférase (TPMT)	

Les EMXT, en particulier les cytochromes P450 (CYPs) [22] et les transporteurs ABC, sont des acteurs centraux en physiopathologie cardiovasculaire. Les EMXT sont importantes lors du suivi de traitements cardiovasculaires car un nombre élevé de médicaments sont des substrats de ces EMXT (ex : CYP2D6, CYP3As, CYP2Cs, ABCB1). Certaines de ces EMXT (ex: CYP2Cs, CYP2J2, ABCA1) interviennent dans le métabolisme de produits endogènes tels que des leukotriènes, des stéroïdes ou des acides biliaires, qui sont à leur tour impliqués dans des voies métaboliques liées au système cardiovasculaire comme l'inflammation, le métabolisme lipidique ou la régulation de la pression artérielle. De plus, de nombreux facteurs environnementaux (tabac, hydrocarbures polycycliques aromatiques et dioxines, alcool et nutriments) modulent leur expression via certains facteurs de transcription tels que PXR (*Pregnane X Receptor*), CAR (*Constitutive Androstane Receptor*), GR (*Glucocorticoid Receptor*) ou AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) [23]. Enfin, les gènes impliqués dans chacune de ces étapes sont le plus souvent polymorphes. Des mutations dans les gènes codants pour ces protéines et des phénomènes d'induction, d'inhibition ou d'interaction, peuvent entraîner des modifications dans la pharmacocinétique des médicaments cardiovasculaires induisant ainsi une toxicité potentielle (ex : inhibition de CYP3A4 ou statut de métaboliseur lent pour CYP3A4 et toxicité cardiaque de la digoxine). D'autre part, ces mécanismes peuvent être à l'origine de pathologies cardiovasculaires innées dès l'enfance (ex : mutation de ABCA1 et maladie de Tangier) ou favoriser l'apparition de certaines de ces pathologies avec l'âge (ex : mutation de ABCA1 et athérosclérose). Des polymorphismes dans les facteurs de régulation de ces gènes (comme PPAR δ par exemple) peuvent également être à l'origine de situations anormales.

1) Phase I de fonctionnalisation

La majorité des réactions de phase I implique une superfamille multigénique d'enzymes, les CYPs. Chez l'homme, il existe 57 gènes répartis en 18 familles et 43 sous-familles (David Nelson, <http://drnelson.utmem.edu/human.P450.table.html>). Chaque protéine, et parfois chaque famille, possède des caractéristiques propres de substrats. Cette spécificité est dite chevauchante car elle n'est pas toujours stricte ; différents cytochromes pouvant prendre en charge un même substrat. Chez l'homme les cytochromes sont localisés principalement dans le réticulum endoplasmique et dans les mitochondries. Ils sont généralement ubiquitaires, présents pour la plupart dans le foie mais aussi dans de nombreux tissus importants en

pathologie cardiovasculaire tels les vaisseaux et le cœur [22]. Certaines isoformes sont spécifiques d'un tissu. Les CYPs interviennent dans de nombreux domaines (Figure 12).

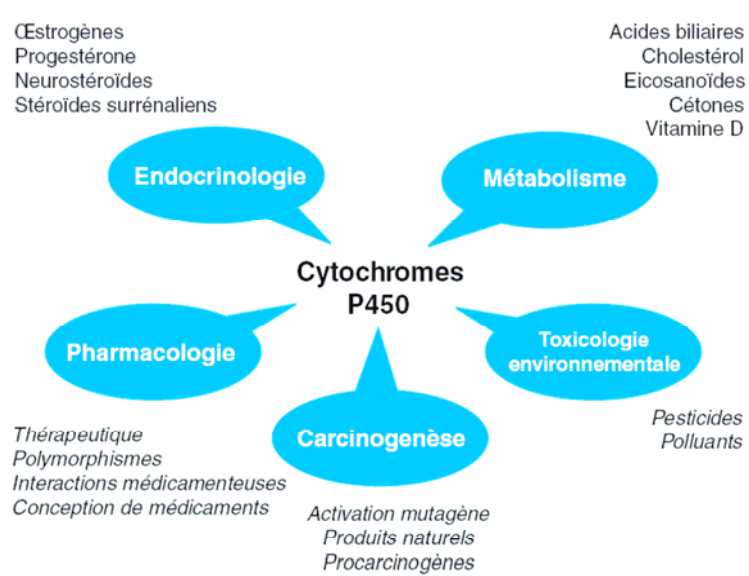


Figure 12 : Rôles attribués aux Cytochromes P450 [24].

Les CYPs ont deux fonctions principales :

- un rôle physiologique dans la biosynthèse et le métabolisme de molécules endogènes tel que cholestérol, acides biliaries, hormones stéroïdes, vitamine D, acide arachidonique, eicosanoïdes et prostaglandines (Tableau IV).

Par exemple, le métabolisme du cholestérol et la biosynthèse des acides biliaries sont fortement dépendants d'enzymes à cytochrome P450. Le CYP51A1 a un rôle clé dans la synthèse du cholestérol et est l'un des cytochromes P450 les mieux conservés au cours de l'évolution. La synthèse des acides biliaries à partir du cholestérol est la principale voie catabolique conduisant à l'élimination du cholestérol de l'organisme. Cette transformation métabolique est catalysée par au moins sept cytochromes P450 différents, dont des membres des familles CYP3, CYP7, CYP8, CYP27, CYP39 et CYP46.

- un rôle de transformation et de détoxification de molécules endogènes, c'est à dire de protection contre l'accumulation et les effets néfastes des composés chimiques : médicaments (coumarine, cyclosporine, rifampicine...), hydrocarbures polycycliques aromatiques et halogénés (benzo(a)pyrène présent dans la fumée de cigarette, dioxines, méthyl-cholantrène), amines aromatiques, additifs alimentaires. Si ces réactions conduisent le plus souvent à l'inactivation des xénobiotiques elles peuvent parfois générer des composés toxiques. Les

cytochromes sont ainsi les principales enzymes responsables de l'activation des carcinogènes chimiques. Chez l'homme, quatre familles quantitativement prépondérantes sont essentielles pour le métabolisme (surtout hépatique) des xénobiotiques (dont de nombreux médicaments cardiovasculaires [19]) dont les sous-familles : 1A, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 3A et 4A (Figure 13).

Tableau IV : Fonctions métaboliques des Cytochromes P450 [20, 24].

CYP	Rôles
CYP1, CYP2, CYP3	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP4	Métabolisme des acides gras, eicosanoïdes, acide arachidonique et médicaments
CYP5	Thromboxane A2 synthase
CYP7	Synthèse des acides biliaires
CYP8	Synthèse des acides biliaires, prostacycline synthase
CYP11	Stéroïdogénèse
CYP17	Stéroïde 17-alpha hydroxylase
CYP19	Aromatase (synthèse des oestrogènes)
CYP21	Stéroïdogénèse, stéroïde 21-hydroxylase
CYP24	Dégradation de la vitamine D, vitamine D-24 hydroxylase
CYP26	Hydroxylation de l'acide rétinoïque
CYP27	Synthèse des acides biliaires, hydroxylations de la vitamine D3
CYP39	7 α -hydroxylation du 24S-hydroxycholestérol
CYP46	Cholestérol 24S-hydroxylase
CYP51	Lanostérol 14-alpha déméthylase (biosynthèse du cholestérol)

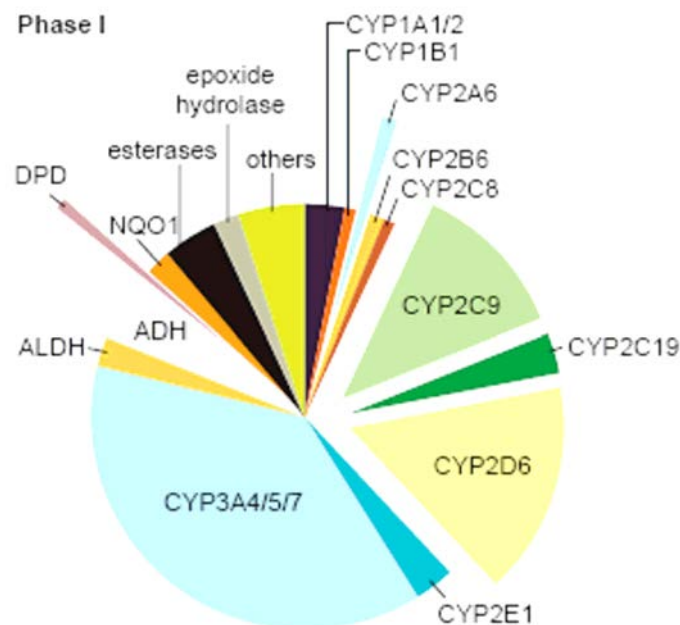


Figure 13 : Part de chaque enzyme de phase I dans le métabolisme des médicaments [21].

Les gènes codant les cytochromes peuvent être modulés, c'est-à dire induits ou inhibés, de façon transcriptionnelle par certains xéno ou endobiotes notamment via les facteurs nucléaires

PXR et CAR. De plus, les CYPs humains sont très polymorphes (Mickael Oscarson, <http://www.cypalleles.ki.se/>). Ceci peut modifier la susceptibilité à certaines pathologies ou modifier la réponse à certains traitements médicamenteux [24].

2) Phase II de conjugaison

La majorité des enzymes de phase II est représentée par les UGTs, les STs, les GSTs et les NATs (Figure 14). Ces enzymes ont également de nombreux substrats physiologiques tels que des leucotriènes et des hormones stéroïdiennes pour les UGTs (Tableau V).

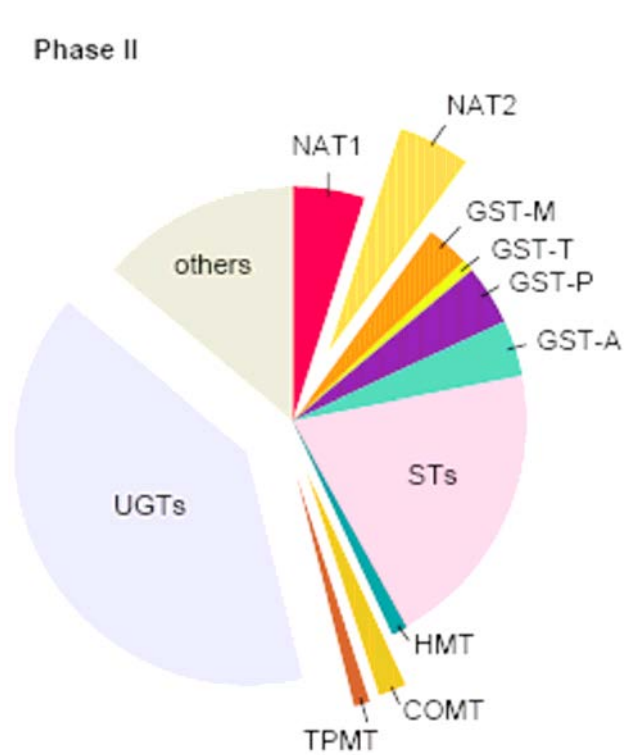


Figure 14 : Part de chaque enzyme de phase II dans le métabolisme des médicaments [21].

Tableau V : Endobiotes substrats des UGTs [20].

Enzymes	Phénotypes (substrats ou métabolites endogènes)
UGT1A1	Bilirubine, oestrogènes (oestradiol, 17 α éthinyloestradiol)
UGT1A3	Leukotriène B4
UGT2B4	Acides biliaires, catéchol, oestrogènes
UGT2B7	Leukotriène B4, acide linoléique, androgènes, oestrogènes, acides biliaires et acides rétinoïques
UGT2B10, 2B11	Acid 13-Hydroxy-octadecadiénoïque (13-HODE), HETE
UGT2B15	Androgènes (dihydrotestosterone), HETE
UGT2B17	Acid 13-Hydroxy-octadecadiénoïque
UGT2B28	Stéroïdes, acides biliaires

3) Phase III de transport

Le transport des molécules exo ou endogènes peut impliquer des mécanismes d'efflux ou d'influx via des transporteurs classés en deux grandes familles : ABC et SLC.

La superfamille des transporteurs ABC se divise en 7 sous familles de ABCA à ABCG et contient 49 membres (Mickael Muller, <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>). Ces transporteurs sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques ATP-dépendants en participant au transport vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule d'une grande variété de substrats dont des acides aminés, peptides, protéines, lipides, saccharides, ions inorganiques, métaux et des médicaments [25].

Les transporteurs de type SLC (*Solute carrier*) sont des transporteurs ATP-indépendants agissant par des mécanismes d'influx ou d'efflux. Il s'agit alors d'un transport actif secondaire, c'est-à-dire que l'apport d'énergie peut se faire par co-transport, d'un ion le plus souvent (ex : Na⁺ dans le cas du transporteur NTCP), ou par un transport antiport (ex : les OATPs et le glutathion). 319 gènes codants les transporteurs SLC ont été identifiés et quelques groupes ont un intérêt majeur dans la distribution des médicaments ou des substrats endogènes (sels biliaires, prostaglandines, ...) notamment [26] :

- OATs (SLC22As) et OATPs (SLC21As) : transport d'anions organiques,
- OCTs, OCTNs (SLC22As) : transport de cations organiques,
- MCTs (SLC1AA1-6) : transport de monocarboxylates,
- PEPTs (SLC15A1/A2) : transport de peptides,
- ENTs (SLC29As) : transport de nucléosides.

B. Transporteurs ABC

1) Définition

Les transporteurs ABC forment une large famille de protéines membranaires, largement retrouvée au cours de l'évolution des bactéries à l'homme. Ils sont nommés ainsi car ils présentent deux domaines « *ATP-binding cassette* » hautement conservés dans leur structure primaire. Ces transporteurs utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour assurer le transport actif de substrats exo ou endogènes. Ils participent ainsi à de nombreux processus physiologiques et certaines pathologies sont associées à leur dysfonctionnement [25, 27]. Ces transporteurs sont classifiés sur la base d'une analyse phylogénétique en 7 sous-familles : ABCA (anciennement ABC1), ABCB (anciennement MDR/TAP), ABCC (anciennement MRP/CFTR), ABCD (anciennement ALD), ABCE (anciennement OABP), ABCF (anciennement GCN2) et ABCG (anciennement White) [28].

2) Structure

Tous les transporteurs ABC partagent une structure moléculaire commune constituée d'un domaine transmembranaire (TMD) et d'un domaine cytoplasmique de liaison aux nucléotides (NBD) [27]. Comme le montre la Figure 15, cette structure de base définit 3 types de conformation. Si les transporteurs sont formés d'un seul TMD et d'un seul NBD, on parle de demi-structures, qui ne seront actives qu'après homo ou hétéro dimérisation (ex : ABCG5/G8) (Figure 15a). D'autres transporteurs sont formés de la fusion de 2 demi-structures et agissent alors comme des flippases (ex ABCA1, ABCB1) (Figure 15b). Deux hypothèses entrent alors en compte : soit ABC transporte la molécule de la bicouche lipidique vers l'extérieur de la cellule, soit le transporteur efflue le substrat du cytoplasme vers le milieu extérieur. Enfin, les transporteurs ABC peuvent également se complexer à d'autres protéines pour former des canaux (ex ABCC8) (Figure 15c).

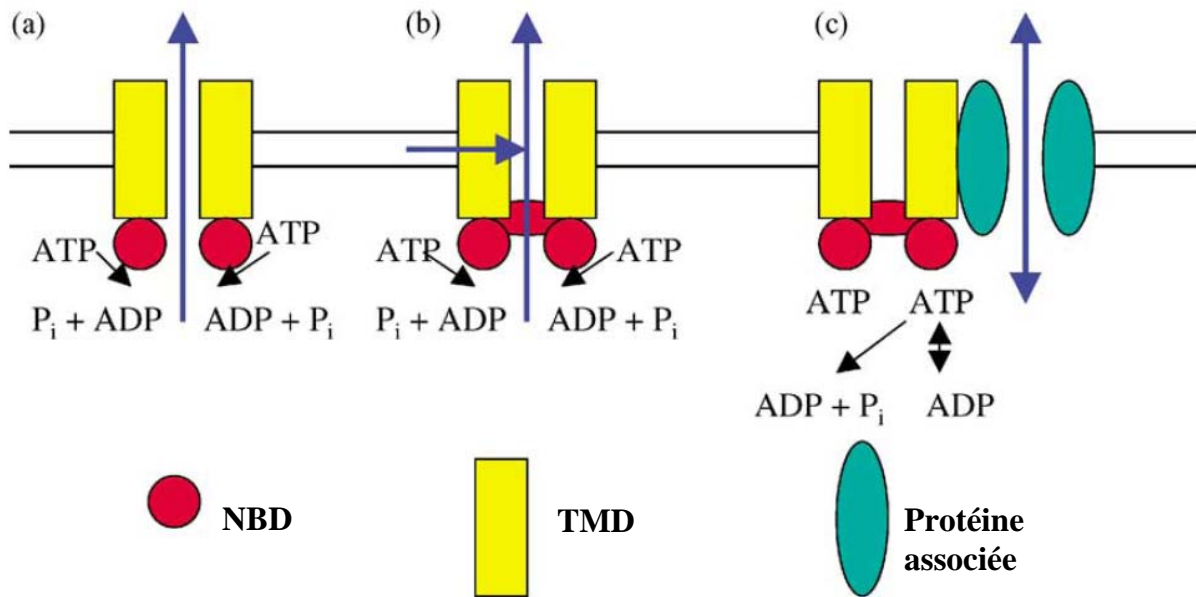


Figure 15 : Différents types de transporteurs ABC. (a) Transporteur en demi-structure (b) Transporteur flippase (c) Complexe récepteur et canal (NBD : Domaine de liaison aux nucléotides. TMD : Domaine transmembranaire). D'après [27].

Chaque domaine architectural joue un rôle déterminé [29]. Les domaines NBD lient et hydrolysent l'ATP et possèdent une grande homogénéité de séquence et des motifs conservés à travers les espèces. Parmi ces derniers se trouvent les motifs Walker A et Walker B, le motif signature (aussi appelée motif LSGGQ, région signature ou région C) et les boucles D, H et Q. Les domaines TMD sont des structures hydrophobes composées de 6 à 11 hélices α qui forment le domaine de liaison au substrat. La spécificité pour le substrat est déterminée par la séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire. Contrairement aux NBD, leur séquence a été moins conservée pendant l'évolution, ce qui reflète la grande diversité des substrats transportés.

3) Substrats, rôles et pathologies associées

Les transporteurs ABC sont impliqués dans le transport vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule, mais également dans le transport intracellulaire, d'un grand nombre de molécules, physiologiques ou non, le plus souvent lipophiles (Tableau VI). Cette fonction est couplée à une fonction d'hydrolyse de l'ATP indépendante qui fournit l'énergie nécessaire au transport

actif. Certains transporteurs sont exprimés de façon ubiquitaire, d'autres sont spécifiques de certains tissus. Ils assurent l'efflux ou la capture de ces substrats à travers les membranes plasmiques, du reticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, de mitochondries ou des peroxysomes [30] (Tableau VI).

Ils transportent une grande variété de substrats physiologiques dont des acides aminés, peptides, protéines de haut poids moléculaire, lipides, saccharides, ions inorganiques, métaux ou vitamines [25]. Ils participent ainsi à de multiples fonctions comme l'absorption de nutriments, l'homéostasie des lipides, l'excrétion de médicaments ou la réponse immunitaire via la sécrétion de cytokines ou la présentation d'antigènes aux cellules T cytotoxiques [25, 27, 31, 32].

Les transporteurs ABC interviennent également dans le transport actif ou l'efflux de nombreux médicaments (absorption, distribution, excrétion). Ainsi, certains anticancéreux peuvent être expulsés des cellules tumorales, provoquant une résistance à la chimiothérapie. Certains médicaments cardiovasculaires peuvent également être des substrats de ces transporteurs. Ainsi la digoxine est transportée par ABCB1 dont le polymorphisme C3435T influence la toxicité de ce cardiotonique à marge thérapeutique étroite [33].

Enfin, les ABC sont impliqués chez l'homme dans certaines maladies monogéniques héréditaires ou dans la susceptibilité à certaines pathologies [20, 30, 32] (Tableau VI). L'exemple le plus connu est la mucoviscidose causée par une anomalie génétique du transporteur ABCC7. Le transporteur ABCC7, ou protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), est une protéine membranaire canal ionique sélectif aux ions chlorures et bicarbonates. Plus de 1000 mutations sur son gène peuvent entraîner un dysfonctionnement ou une absence de la protéine. Ce trouble génétique affecte le fonctionnement de l'ensemble des glandes exocrines de l'organisme ainsi que des fonctions d'excrétion de l'eau dans les épithéliums spécialisés.

Tableau VI : Localisations, fonctions et pathologies associées aux principaux transporteurs ABC [20, 30, 34] <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>.

ABC	Localisations	Substrats physiologiques	Pathologies associées
ABCA1 (ABC1)	Ubiquitaire (Macrophage, foie, intestine, cerveau)	Cholestérol libre, phospholipides, vitamine E	Maladie de Tangier, Hypoapoalphalipoproteinemie familiale, Athérosclérose
ABCA2 (ABC2)	Cerveau	Stérols	Maladie d'Alzheimer? + Résistance médicamenteuse
ABCA3	Poumon, cerveau,	Phospholipides surfactants	Déficiencia néonatale en surfactant

(ABC3)	coeur, pancreas		
ABCA4 (ABCR)	Photorécepteurs	Retinoides	Rétinopathies, Dégénérescence maculaire liée à l'âge, Dystrophie (cônes et batonnets)
ABCA7	Rate, thymus, moelle osseuse, leucocytes, cerveau, surrénales, utérus	Phospholipides, Sphingolipides	Syndrome de Sjogren ?
ABCB1 (MDR1, ABCB1)	Nombreux tissus dont ceux avec une fonction de barrière (foie, barrière hémato-encéphalique, intestine, rein, placenta) membrane apicale	Phospholipides (Phosphatidylcholine), Sphingomyéline, PAF, peptide bêta amyloïde, hormones stéroïdiennes (estradiol), aldostérone, somatostatine, substance P) et transport probable du cholestérol	Colite ulcéraire + Résistance médicamenteuse
ABCB2 (Tap1)	Ubiquitaire, RE	Peptides	Déficit immunitaire
ABCB3 (Tap2)	Ubiquitaire, RE	Peptides	Déficit immunitaire
ABCB4 (MDR3)	Foie, membrane apicale	Phospholipides	Cholestase intra-hépatique familiale progressive 3, Cholestase intra-hépatique de la grossesse
ABCB6	Mitochondries	Fer	?
ABCB7	Mitochondries	Fer	Sidéroblastose liée à l'X et anémie
ABCB11 (BSEP)	Foie, membrane apicale	Sels biliaires	Cholestase intra-hépatique familiale progressive 2
ABCC1 (MRP1)	Poumon, testicules, PBMC	Leucotriènes	? + Résistance médicamenteuse
ABCC2 (MRP2)	Foie	Bilirubine-glucuronides, estradiol 17-b-dglucuronide, conjugués du glutathion, leucotriènes (LTC4)	Syndrome de Dubin-Johnson
ABCC6 (MRP6)	Rein, foie	Cyclopeptides anioniques, Leucotriènes, conjugués au GSH	Pseudoxanthoma elasticum
ABCC7 (CFTR)	Tissus exocrines	Ions chlorures (canal)	Mucoviscidose
ABCC8 (SUR1)	Pancréas	Récepteurs aux Sulfonylurées	Hypoglycémie hyperinsulinémique persistante familiale de l'enfance Diabète non insulino dépendant
ABCC9 (SUR2)	Coeur, muscles	Récepteurs aux Sulfonylurées	Cardiomyopathie dilatée avec tachycardie ventriculaire
ABCC10 (MRP7)	Expression faible dans tous les tissus	Anions lipophiles (ex Estradiol 17-b-d glucuronide)	
ABCD1 (ALD)	Peroxisomes	Acides gras à très longue chaîne	Adrenoleukodystrophie
ABCE1	Ovaires, testicules, rates	Protéine liant l'oligoadenylate	?
ABCG1 (White)	Ubiquitaire	Cholestérol, phospholipides	?
ABCG2 (BCRP)	Placenta, foie, rein, intestine, cellules souches	Estrogènes sulfatés, phytoestrogènes, flavonoides	Protoporphyrine IX + Résistance médicamenteuse
ABCG4	Foie	Cholestérol transport	?
ABCG5 & ABCG8	Foie, Intestin	Stérols végétaux (campestérol et sitostérol), cholestérol et ses précurseurs (lathosterol, desmosterol, cholestanol, acides biliaires)	Sitostérolémie

4) Transporteurs ABC et métabolisme lipidique

L'analyse des profils génétiques et d'expression (ARNm, protéines) des transporteurs ABC présente un très grand intérêt tant en recherche, spécialement dans le domaine des désordres métaboliques et des résistances aux médicaments, qu'en diagnostic clinique ou en monitoring des effets d'un médicament [32]. Ces molécules sont également des cibles potentielles pour de nouveaux médicaments traitant des pathologies cardiovasculaires comme les désordres lipidiques ou l'athérosclérose [32, 35].

De nombreux transporteurs ABC sont impliqués dans le transport et l'homéostasie des lipides entre différents tissus et peuvent être régulés par ces mêmes lipides (Figure 16) [30, 36-38]. Ces transporteurs appartiennent notamment aux sous-familles ABCA et ABCG [39-41] et les plus étudiés dans ce domaine sont à l'heure actuelle ABCA1, ABCG1 et ABCG5/G8.

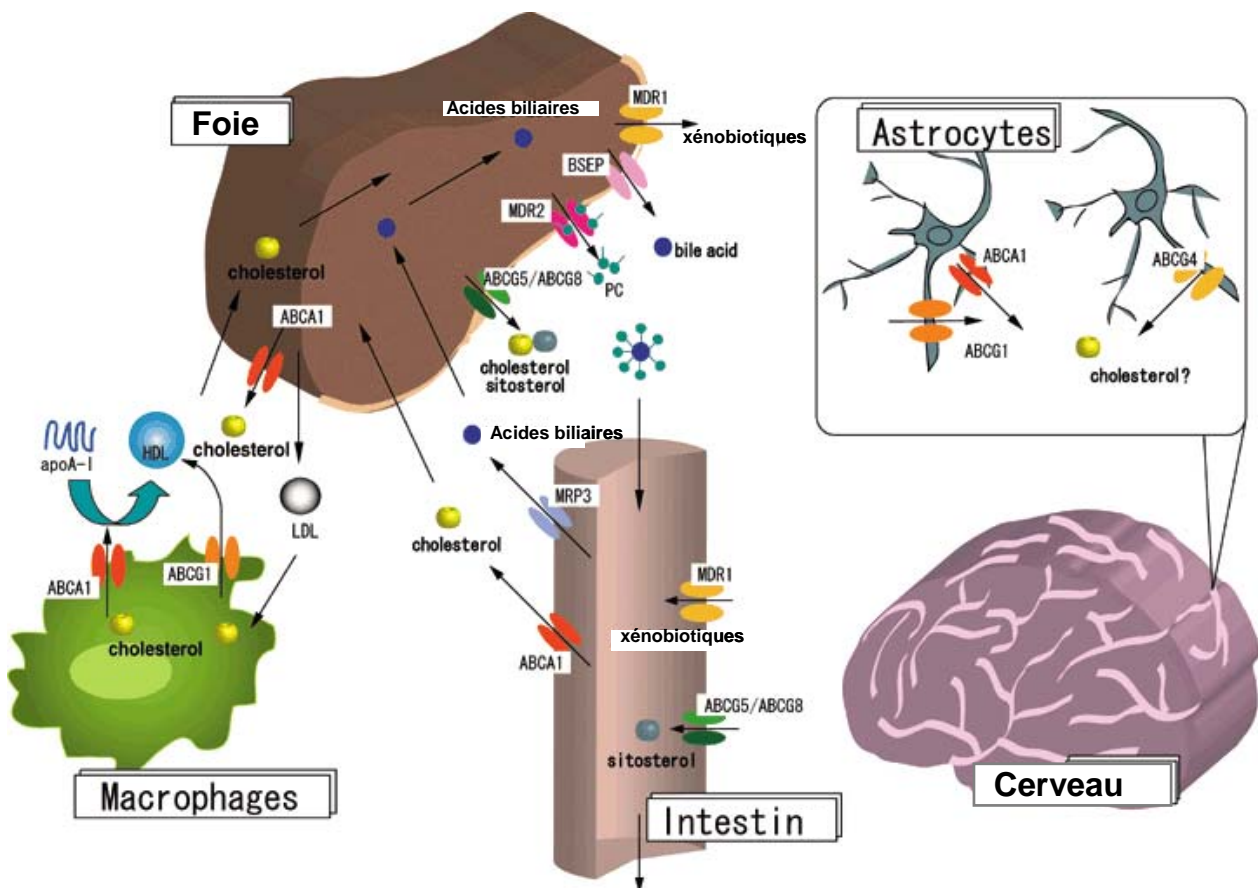


Figure 16 : Transporteurs ABC et homéostasie des lipides. D'après [42].

Le transporteur ubiquitaire ABCA1 est la protéine clé et limitante du transport inverse du cholestérol des cellules périphériques vers le foie [25, 43, 44]. Il assure le transport du cholestérol des cellules épithéliales intestinales vers le sang et est une étape limitante de la formation des HDL dans le foie. De plus, ABCA1 assure l'efflux du cholestérol et de phospholipides (principalement la phosphatidylcholine) de la cellule, notamment le macrophage, vers les apolipoprotéines A1 pauvres en lipides fixées à sa surface pour générer des pré-béta-HDL [25, 45].

Certaines aberrations génétiques d'*ABCA1* entraînent des syndromes de déficits plus ou moins sévères en HDL et contribuent ainsi à l'athérosclérose et à d'autres pathologies cardiovasculaires [27]. La forme la plus grave est la maladie de Tangier [25, 46]. C'est une maladie homozygote à transmission récessive, caractérisée par un déficit sévère en HDL plasmatiques, un taux très bas d'apoA1 et une accumulation d'esters de cholestérol intracellulaires (notamment dans les macrophages). La forme hétérozygote est l'hypoalphalipoprotéïnémie familiale. Enfin, certaines mutations et polymorphismes d'*ABCA1* contribuent aux taux plasmatiques des paramètres lipidiques et à la sévérité des maladies cardiovasculaires [47]. Certains des polymorphismes de la région codante sont en fort déséquilibre de liaison et quelques uns des haplotypes obtenus ont été associés à des variations du HDL plasmatique [48]. De plus, la présence de l'allèle muté 1587K paraît associé à des taux faibles de HDL tandis que 771M paraît associé à des taux plus élevés [46]. V825I, I883M et E1172D pourraient également influencer les taux de HDL [47]. Des polymorphismes d'*ABCA1* entraîneraient également des variations de l'ApoA1 plasmatique. Ainsi, d'après Tregouet et al., [49] C-564T et R1587K sont associés au taux plasmatique d'ApoA1.

ABCG1 et G4, qui fonctionnent en homo ou en hétérodimères, interviendraient dans la régulation du métabolisme des HDL et dans le transport inverse du cholestérol en effluant le cholestérol intracellulaire et les sphingomyélines vers les HDL plasmatiques plutôt que vers l'ApoA1 libre [45, 50]. A l'image d'*ABCA1*, *ABCG1* agit comme un facteur protecteur contre le développement de l'athérosclérose [51]. Il est exprimé de façon ubiquitaire et, comme *ABCA1*, il est fortement exprimé dans les monocytes/macrophages [52]. Il interviendrait après *ABCA1*, pour former dans une seconde étape les complexes apolipoprotéiques [30]. *ABCA1* permettrait ainsi la formation des particules natives d'HDL qui serviraient ensuite d'accepteurs pour le cholestérol exporté par *ABCG1* et G4 [37, 45].

Moins ubiquitaire, ABCG4 serait particulièrement impliqué dans le transport du cholestérol au niveau cérébral [50].

ABCG5 et ABCG8 sont 2 transporteurs exprimés dans l'intestin, le foie et la vésicule biliaire [53]. Ils agissent en hétérodimères et interviennent dans le contrôle de l'homéostasie des stérols totaux du corps. Ces 2 protéines limitent l'absorption des stérols issus des plantes en les secrétant de l'épithélium intestinal vers la lumière et en favorisant la sécrétion des stérols et du cholestérol hépatique dans la bile [37, 54, 55]. Le gène de l'un ou l'autre de ces transporteurs est défectueux dans la bêta sitostérolémie (ou phytostérolémie). Ce trouble du métabolisme lipidique associé à une diminution de la synthèse du cholestérol endogène et à une hypercholestérolémie, peut conduire à une athérosclérose coronaire et aortique prématurée [25]. D'autre part, certains polymorphismes de ces transporteurs influencent les taux de cholestérol plasmatique dans la population générale [56, 57].

D'autres transporteurs interviennent dans le transport de lipides mais sont plus tissu-spécifiques. Par exemple, ABCB4 (MDR3) est abondant dans les membranes canaliculaires des hépatocytes et est sélectif du transport de la phosphatidylcholine du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche lipidique, jouant un rôle important dans la production de la bile. Certaines mutations de ce transporteur sont associées à une cholestase familiale [58].

Bien que le mécanisme d'action soit mal élucidé, le transporteur ABCB1 interviendrait comme d'autres transporteurs ABC dans l'homéostasie du cholestérol. Il est ainsi particulièrement intéressant puisqu'il pourrait représenter un nouveau biomarqueur du risque cardiovasculaire. En effet, si l'on considère l'approche pharmacogénomique que nous avons proposée dans le chapitre précédent pour tendre vers une médecine personnalisée, il interviendrait au niveau de la pharmacocinétique de nombreux médicaments agissant sur le métabolisme lipidique, mais également au niveau des cycles métaboliques de substrats endogènes spécifiquement en cause dans l'apparition de l'athérosclérose.

III. Transporteur ABCB1

A. Localisations et structure

Le transporteur ABCB1, encore appelé P-glycoprotéine (p-gp) ou ABCB1, a été mis en évidence pour la première fois chez la lignée cellulaire CHO (*Chinese Hamster Ovary*) résistante à la colchicine puis ensuite dans diverses lignées cancéreuses chimiorésistantes [59]. Cependant ABCB1 est aussi présent dans de nombreux tissus sains de l'organisme, notamment ceux impliqués dans la pharmacocinétique des médicaments [31]. Ainsi il est exprimé au niveau des tissus ayant des fonctions sécrétoires et excrétoires comme la surface canaliculaire des hépatocytes, le pôle apical des cellules tubulaires rénales et la bordure en brosse des entérocytes. ABCB1 est également exprimé au niveau des barrières sang-tissus comme la barrière hémato-encéphalique et le placenta ainsi que dans le cœur, les ovaires, les testicules et les surrénales. Enfin, il a été détecté dans les cellules souches hématopoïétiques, les cellules mononuclées du sang périphérique telles que les monocytes/macrophages, les cellules Natural Killer et les lymphocytes T et B [31].

ABCB1 est localisé dans les membranes : plasmique, nucléaire, du réticulum endoplasmique granuleux et de l'appareil de Golgi. On le trouve plus précisément au niveau des radeaux lipidiques et des cavéoles, microdomaines membranaires particulièrement en cholestérol.

Au plan structural, c'est une glycoprotéine transmembranaire phosphorylée et glycosylée de 170 kDa [60, 61], codée par le gène très polymorphe *ABCB1* mieux connu sous le nom de gène *MDR1* (*Multidrug Resistance 1*). ABCB1 est composé de 1280 acides aminés formant 2 séquences homologues et symétriques contenant chacune un domaine transmembranaire (TMD) et un motif NBD à ATP-binding cassette [31] (Figures 17 et 18).

espace extracytosolique

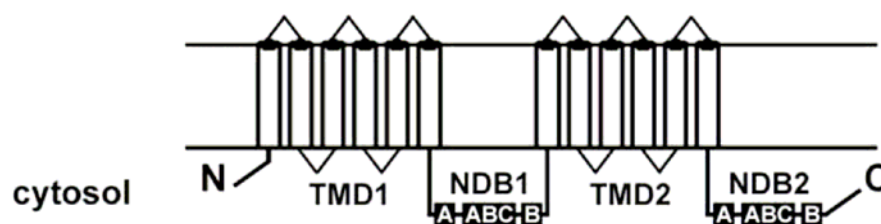


Figure 17 : Structure en 2 dimensions du transporteur ABCB1 [62].

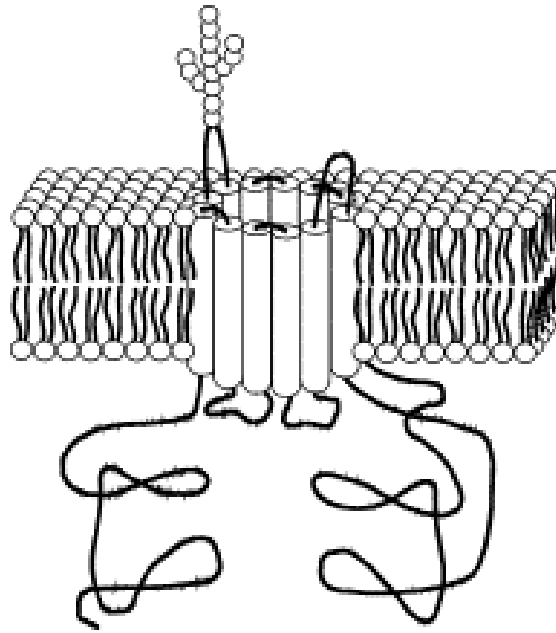


Figure 18 : Représentation tri-dimensionnelle du transporteur ABCB1 [25].

Les différentes modifications conformationnelles mises en jeu lors de l'hydrolyse de l'ATP et du transport d'un substrat par ABCB1 n'ont pas encore été clairement définies. Il y aurait cependant implication des étapes suivantes [28, 63] :

- initiation de la voie de transport par la liaison de l'ATP et/ou du substrat,
- changements conformationnels au niveau des NBD suite à la fixation et/ou à l'hydrolyse de l'ATP,
- transmission des changements conformationnels aux TMD provoquant une diminution de l'affinité au niveau du site de liaison du substrat (phase de libération du substrat),
- retour à la conformation initiale (réinitialisation de la pompe).

Deux modèles alternatifs concernant le mécanisme d'action d'ABCB1 ont été proposés [28, 64]). L'étape initiatrice est soit la dimérisation des NBD soit l'hydrolyse de l'ATP. Selon le premier modèle, lors de la fixation du substrat, les NBD se dimérisent et 2 molécules d'ATP se fixent simultanément puis sont hydrolysées pour permettre le transport actif du substrat. Dans le second modèle, après fixation du substrat, les deux molécules d'ATP sont hydrolysées successivement et il n'y a pas de dimérisation des NBD [28, 64].

Le mécanisme par lequel ABCB1 transporte le substrat à travers la membrane n'est pas non plus encore clairement élucidé. Plusieurs modèles de fonctionnement de la pompe ont été avancés, dont les plus pertinents seraient : l'aspirateur hydrophobe (*hydrophobic vacuum cleaner*) et la « flippase » [28]. Le consensus général est que la pompe fonctionne comme un

aspirateur hydrophobe extrayant le substrat de la membrane interne et le pompant directement jusqu'au milieu aqueux extérieur. Dans le modèle alternatif de flippase, le substrat est flippé de la membrane interne vers la membrane externe ou directement dans le milieu extracellulaire [28].

B. Rôles et substrats

ABCB1 possède une grande variété de substrats exogènes ou endogènes pour la plupart lipophiles. Initialement il a été identifié comme une protéine conférant une résistance à de multiples traitements anticancéreux en effluant ces traitements hors des cellules tumorales. Il est admis que de nombreux phénomènes de résistance à des traitements médicamenteux sont associés à ce transporteur [31]. Sa distribution tissulaire suggère qu'il influence la réponse au médicament et à sa toxicité [59]. Ce qui est renforcé par le fait qu'ABCB1 est souvent co-localisé avec CYP3A4 et que les 2 protéines possèdent de nombreux substrats en commun [31]. ABCB1 a notamment un rôle de protection de l'organisme en exportant les toxiques à l'extérieur de l'organisme notamment via la bile et les urines. Il prévient ainsi leur accumulation dans les organes vitaux [31]. ABCB1 est en effet impliqué dans la phase III du métabolisme des médicaments. Il transporte de nombreux médicaments dont certains anticancéreux, immunosuppresseurs, antirétroviraux, médicaments du système nerveux central, opiacés et antiémétiques [31, 65] et Jessica Oesterheld, <http://mhc.com/PGP/>. ABCB1 transporte également de nombreux médicaments cardiovasculaires dont des antihypertenseurs, statines, et certains antiarythmiques [19].

De nombreuses études ont été conduites sur l'importance de ce transporteur dans des situations pathologiques et en réponse à des traitements médicamenteux. L'implication physiologique d'ABCB1 est moins connue [66]. ABCB1 a pourtant de nombreux substrats physiologiques endogènes [67, 68]. Il transporterait en effet l'aldostérone, le facteur activant les plaquettes PAF (*Platelet-activating factor*) ou encore des peptides tels que la somatostatine [20]. Le peptide β -amyloïde serait également transporté par ABCB1 qui pourrait ainsi être impliqué dans la maladie d'Alzheimer [69]. ABCB1 jouerait également un rôle dans le système immunitaire par la sécrétion de certaines cytokines, de facteurs de croissance, et de molécules cytotoxiques [27, 67]. Ainsi l'IL-2 (*Interleukin 2*), l'IL-4 (*Interleukin 4*) et l'interféron γ sont des substrats du transporteur ABCB1 leucocytaire.

Jonhstone et al., ont également proposé un rôle pour ABCB1 dans la régulation de la différenciation cellulaire et de l'apoptose [67]. Les phospholipides et les hormones stéroïdiennes comme l'œstradiol sont également des substrats d'ABCB1. Enfin, comme d'autres transporteurs ABC, ABCB1 interviendrait dans l'homéostasie des lipides et pourrait être impliqué dans les pathologies cardiovasculaires. Le transport du cholestérol par ABCB1 est fort probable mais n'a jamais été démontré *in vivo*.

C. Polymorphismes du gène *ABCB1*

1) Polymorphismes d'intérêt

Le gène codant pour le transporteur ABCB1 est un gène très polymorphe situé sur le bras long du chromosome 7 en 7q21.1. Il est constitué d'une région promotrice et de 28 exons (3843 paires de bases) [70]. D'après Hoffmeyer et al., la majorité des individus possède au moins un allèle muté dans le gène *ABCB1* [71]. A l'heure actuelle, plus de 30 polymorphismes (ou SNPs pour *Single Nucleotide Polymorphisms*) ont été reportés sur ce gène [70]. Certains de ces polymorphismes sont dans la région promotrice, d'autres dans les exons ou encore dans les introns (Figure 19). En fonction de leur localisation et de la nature de la mutation, les polymorphismes peuvent avoir un effet sur l'expression ou l'activité du transporteur de différentes manières [72] :

- changement d'acide aminé,
- atteinte de la séquence du promoteur,
- atteinte de la stabilité de l'ARNm,
- atteinte du processus d'épissage.

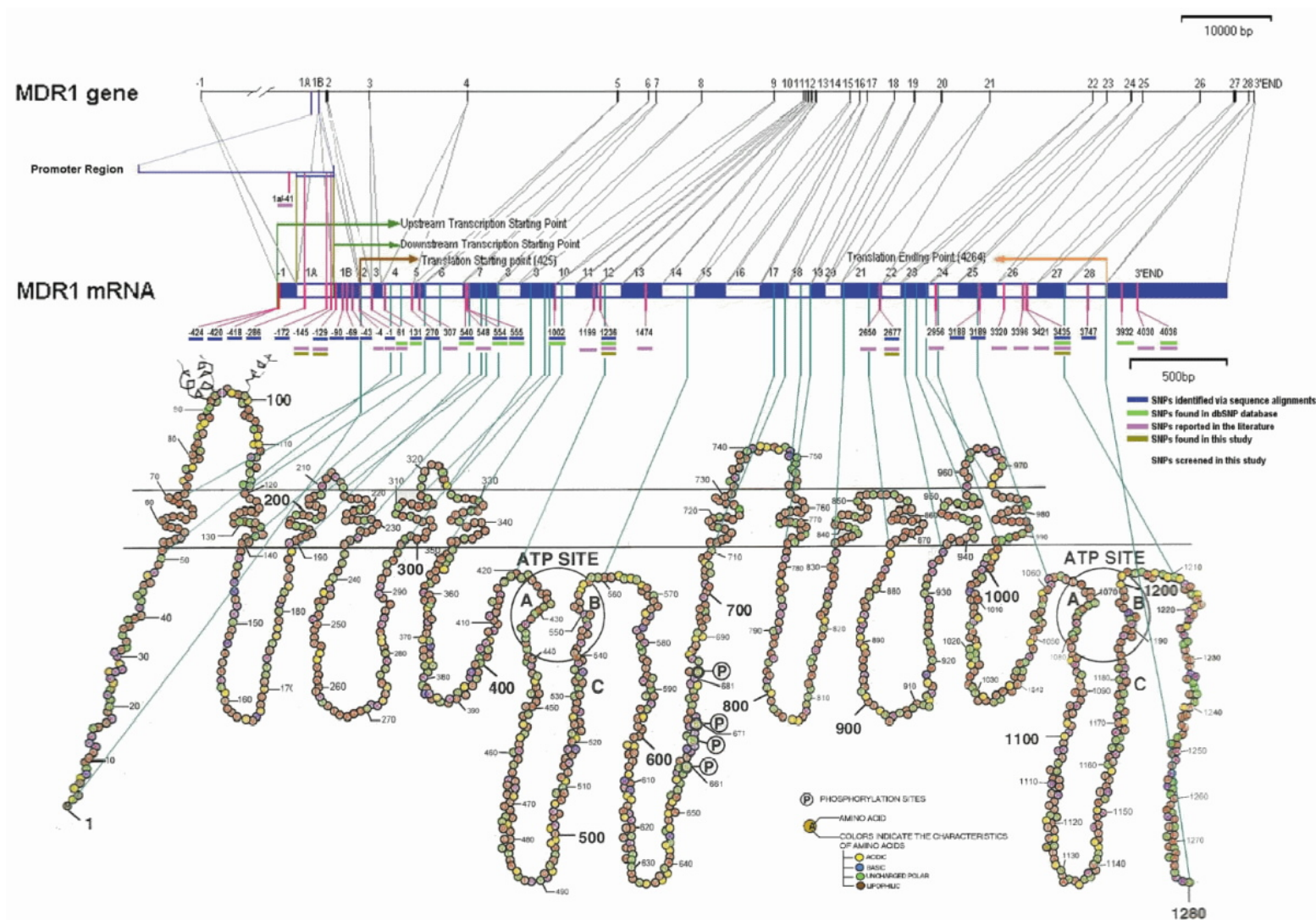


Figure 19 : Schéma du gène *ABCB1*, de l'ARNm, et de la structure secondaire de la protéine. Les SNPs sont numérotés en accord avec la séquence d'ARNm, avec le nucléotide A du codon start en position 1. Les acides aminés sont jaune, bleu, vert ou marron pour des résidus acides, basiques, neutres ou lipophiles respectivement. Les domaines de liaison à l'ATP sont entourés et les motifs signature caractérisés par les lettres A, B et C [73].

Plusieurs polymorphismes retiendront par la suite notre attention dans cette étude car, d'une part, leur fréquence est élevée dans la population caucasienne et d'autre part, ils ont été associés dans la littérature à des modifications de l'expression et/ou de l'activité du transporteur ABCB1 (Tableau VII). Il s'agit de :

- **T-129C** dans l'exon 1b, se situe 7 paires de base en aval du site d'initiation de la transcription dans la région promotrice [61],
- **G-1A** est localisé dans l'exon 2 au niveau du nucléotide qui précède directement le codon ATG qui initie la traduction et pourrait ainsi affecter cette traduction [71],
- **A61G** localisé dans l'exon 2 près de l'extrémité N-terminale de la protéine est responsable de la substitution d'une Asparagine en position 21 par un acide aspartique [65],
- **G1199A** dans l'exon 11 se traduit par la substitution d'une sérine par une asparagine en position 400 de la chaîne d'acides aminés. Cette substitution est localisée dans la boucle cytosolique près du premier domaine de liaison à l'ATP [65]. Elle entraîne une modification importante de la taille de la chaîne latérale de la protéine et pourrait changer sa charge et sa structure [71],
- **C1236T** est un polymorphisme silencieux situé dans l'exon 12 [74]. L'effet de ce polymorphisme est controversé puisqu'il est situé dans une région non codante et non promotrice. D'après certains auteurs il serait dû à un déséquilibre de liaison entre C3435T et G2677T/A et/ou C1236T [75],
- **T-76A** est localisé dans l'intron 16 près d'un site de jonction entre exons [71],
- **G2677T/A** est un polymorphisme triallélique de l'exon 21 lié à la substitution d'une Guanine par une Thymine ou une Adénosine. Ces mutations sont associées à une substitution d'alanine respectivement en sérine ou en thréonine en position 893 de la chaîne d'acides aminés. Ce polymorphisme localisé du côté intracellulaire de la protéine après la dixième région transmembranaire entraîne le remplacement d'un acide aminé apolaire par un acide aminé polaire. Cela pourrait affecter la structure secondaire et la conformation de la protéine ainsi que la précision de l'interaction avec ses substrats [61, 76],
- **C3435T** est un polymorphisme de l'exon 26. Cette mutation n'est pas associée à un changement d'acide aminé et est située à une position non codante [61]. C'est un polymorphisme dit synonyme ou silencieux.

Tableau VII : Polymorphismes d'intérêt du transporteur ABCB1. D'après [70].

Polymorphismes	Effet	Fréquence de l'allèle muté chez les Caucasiens
T-129C exon 1b (rs3213619)	Non codant. Effet ?	0,06
G-1A exon 2 (rs2214102)	Non codant. Traduction ?	0,09
A61G exon 2 (rs9282564)	ASN21asp	0,11
G1199A exon 11 (rs2229109)	SER400asp	0,05
C1236T exon 12 (rs1128503)	Silencieux	0,41
T-76A exon 17 (rs1922242)	Intronique	0,46
G2677W exon 21 (rs2032582)	ALA893ser/thr	0,42/0,02
C3435T exon 26 (rs1045642)	Silencieux	0,54

2) Effets des polymorphismes

Au vu de l'importance d'ABCB1 dans le transport de nombreux substrats médicamenteux, de nombreux efforts ont été menés pour identifier les polymorphismes d'ABCB1 qui pourraient expliquer la variabilité interindividuelle de l'expression et des fonctions du transporteur. Certains de ces polymorphismes ont été associés avec une modulation de l'expression et de l'activité d'ABCB1. Quelques uns ont été impliqués dans les variations de la pharmacocinétique de substrats médicamenteux et dans la variabilité de la réponse biologique à ces traitements. Enfin, quelques variants sont associés à la susceptibilité à certaines pathologies. De nombreuses revues font la synthèse des associations observées avec ces polymorphismes [31, 59, 65, 70, 74, 77].

(a) Modulation de l'expression et/ou de l'activité du transporteur

Certains polymorphismes d'ABCB1 ont été associés avec une altération de l'expression de l'ARNm d'ABCB1, de l'expression de la protéine ou de l'activité du transporteur in vitro ou dans différents tissus notamment l'intestin [65, 68, 72, 74, 77].

Par exemple, l'allèle muté en position -129 du promoteur a été associé à une diminution de l'expression d'ABCB1 dans le placenta, ce que les auteurs expliquent par le fait que l'allèle T est essentiel pour l'initiation [61]. Cependant, cet allèle muté a également été associé à une augmentation de l'expression dans des cellules souches hématopoïétiques et dans des cellules d'hépatomes [78].

Woodahl et Yang ont montré que l'allèle muté en position G1199A altère l'efflux et la perméabilité transépithéliale d'ABCB1 in vitro [79]. Ces auteurs proposent que ce polymorphisme modifie la reconnaissance du substrat suite à l'altération de la séquence en acides aminés.

Le variant triallélique G2677T/A a été associé à une augmentation de l'expression de l'ARNm dans les entérocytes duodénaux de sujets sains [80] et dans le cœur [81]. Par contre, l'homozygotie pour l'allèle muté en 2677 a également été associée à une plus faible expression de la protéine dans le placenta [61]. Kim and al., [82] ont montré in vitro une augmentation de l'activité du transporteur dans des cellules exprimant le variant 893Ser (diminution de la moitié de la concentration intracellulaire en substrat digoxine) bien que le taux d'expression d'ABCB1 soit identique dans les cellules porteuses de Ala893 ou 893Ser. Ils confirment leurs résultats in vivo, les porteurs du variant Ser893 ont en effet des taux plus faibles de féxofénadine (un autre substrat d'ABCB1). D'après ces auteurs, bien que le mécanisme ne soit pas clair, il a été montré que certains résidus Sérine d'ABCB1 sont sujets à phosphorylation par la protéine kinase C. Ils proposent donc que la modification de l'activité d'ABCB1 chez les porteurs du variant 893Ser, pourrait être lié à la phosphorylation du résidu Serine.

Enfin, l'allèle muté du polymorphisme C3435T a été associé à une augmentation de l'expression d'ABCB1 dans les entérocytes duodénaux [83]. A l'inverse, d'autres auteurs associent l'allèle muté à une diminution de l'expression d'ABCB1 dans le duodénum [71, 84], dans le rein [31], et dans les lymphocytes [85] ce qui est en accord avec l'étude de Wang et al., [86] selon lesquels le variant 3435T diminuerait la stabilité de l'ARNm d'ABCB1 bien qu'il ne soit pas situé dans une région codante.

(b) Effets associés à la prise de médicaments

En modifiant l'expression et/ou l'activité d'ABCB1, les polymorphismes pourraient moduler la pharmacocinétique (absorption, distribution tissulaire et excrétion) de certains substrats médicamenteux et modifier la réponse biologique à ces traitements (efficacité, survenue d'effets indésirables).

(i) Modification de la pharmacocinétique des médicaments

Les polymorphismes du gène codant le transporteur ABCB1 peuvent faire varier la pharmacocinétique de nombreux substrats transportés. Chez les individus présentant une augmentation de l'expression ou de la fonction du transporteur ABCB1, on s'attendra ainsi à une diminution de la biodisponibilité par voie orale, une diminution des concentrations plasmatiques maximum et/ou une augmentation de la clairance [72]. La littérature s'est attachée notamment à suivre les associations entre les génotypes d'*ABCB1* et la variabilité de la clairance et des aires sous la courbe de substrats typiques (et à marge thérapeutique étroite) tels que des immunosuppresseurs (cyclosporine, tacrolimus), des anticancéreux (irinotécan, docetaxel), des antirétroviraux (nelfinavir) des médicaments du système cardiovasculaire (digoxine), ou encore la fexofénadine ou le lopéramide [31, 59, 65, 68, 72, 74, 77]. Par exemple, Hoffmeyer et al., ont été les premiers à montrer in vivo que C3435T est corrélé significativement avec le taux d'expression duodénale d'*ABCB1* et avec la biodisponibilité de la digoxine par voie orale [71]. Ainsi les homozygotes pour l'allèle T présentent une expression d'*ABCB1* deux fois plus basse que les homozygotes pour l'allèle C et donc des taux plasmatiques de digoxine plus élevés chez les homozygotes TT que chez les CC [71].

(ii) Modification de la réponse aux médicaments

En plus d'un effet sur la pharmacocinétique des substrats transportés, les polymorphismes peuvent influencer la réponse biologique à de nombreux traitements substrats d'*ABCB1* au niveau de leur pharmacodynamie (efficacité du traitement, effets indésirables). Nous détaillerons ici l'exemple des antirétroviraux et celui des statines.

De nombreux antirétroviraux sont des substrats ou des modulateurs d'*ABCB1* et les polymorphismes tels que C3435T pourraient expliquer une partie de la variabilité de la réponse aux antirétroviraux [85, 87]. En modifiant la concentration en médicaments au niveau des cellules cibles lymphocytaires, les polymorphismes d'*ABCB1* peuvent jouer un rôle important dans l'efficacité des antirétroviraux. Ainsi, chez des enfants infectés par le VIH1, les hétérozygotes pour C3435T présentent une réponse plus rapide au traitement et une concentration plasmatique en nelfinavir supérieure aux homozygotes CC [88]. Une autre

étude va dans le même sens en concluant que les sujets homozygotes pour l'allèle T montrent une plus grande élévation du nombre de lymphocytes CD4+ suite à un traitement antirétroviral ; ces sujets sont donc de meilleurs répondeurs [85]. Fellay et al., proposent que cet effet serait dû à une augmentation de la pénétration de l'antiviral dans les cellules CD4+. De plus, ABCB1 pourrait affecter la fusion du virus et le relargage des virions [31]. Par ailleurs, l'efflux des inhibiteurs de protéases par ABCB1 dépendrait du polymorphisme G1199A. Ceci a un impact sur la biodisponibilité de ces molécules et leur pénétration dans les cellules et dans certains tissus (lymphoïde et système nerveux central) [79].

De nombreux traitements antirétroviraux ont des effets secondaires au niveau des paramètres lipidiques. Ainsi, les inhibiteurs de protéases (ex : ritonavir) entraînent souvent une augmentation des triglycérides et du cholestérol total et une diminution du HDL cholestérol tandis que les inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase seraient plus favorables au niveau lipidique [89]. Par exemple, un traitement d'un an par Efavirenz entraîne une augmentation de la concentration plasmatique de cholestérol total, du LDL et du HDL [90]. Cette augmentation serait différente en fonction du génotype du patient pour *ABCB1*, notamment pour C3435T [90]. En effet, concernant le HDL, l'augmentation des valeurs est significativement différente en fonction du polymorphisme de C3435T considéré. Ainsi, il n'y a pas de variation significative du taux d'HDL après un an de traitement par Efavirenz pour le génotype TT, augmentation de 11,8% pour les CT et de 36,5% pour les CC.

Les statines sont des médicaments hypolipémiants qui agissent en réduisant le cholestérol-LDL et en augmentant le cholestérol-HDL. Ce sont des substrats d'*ABCB1* et quelques unes peuvent moduler l'activité du transporteur [72]. Plusieurs études ont montré que les polymorphismes d'*ABCB1* modulent la réponse au traitement par les statines. Les porteurs des variants 1236T, 2677W ou 3435T et de l'haplotype 1236T-2677W-3435T auraient ainsi une diminution plus forte du taux de LDL et de cholestérol total après traitement par les statines [91, 92].

Kajinami K et al., [92] ont été les premiers à émettre l'hypothèse que des variants d'*ABCB1* seraient des déterminants génétiques de la réponse lipidique à un traitement par statine. Ils ont étudié les polymorphismes C3435T et G2677W et les ont corrélé à la réponse au traitement par atorvastatine sur les paramètres lipidiques suivants : cholestérol total, LDL et HDL cholestérol, triglycérides. Bien que l'association ne soit pas significative chez les hommes, ces auteurs montrent qu'après traitement par atorvastatine, les femmes porteuses du variant 3435T ou de l'haplotype 2677T/A-3435T ont une augmentation plus faible des HDL et une

réduction plus forte du LDL que les homozygotes pour l'allèle sauvage [92]. Il est à noter qu'avant traitement, les femmes porteuses d'au moins un variant de l'allèle 2677 présentent un taux significativement plus élevé de LDL que les non porteuses [92]. Bercovich et al., [93] ont étudié l'effet potentiel de 5 polymorphismes d'*ABCB1* et de 6 polymorphismes de la *CETP* (et les haplotypes correspondants) sur la réponse lipidique au traitement par fluvastatine chez 76 sujets. Dans cette étude, il apparaît que la *CETP* et *ABCB1* ont des effets indépendants sur les variations de taux de lipides plasmatiques suite au traitement dues à des modulations de facteurs pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Pour *ABCB1*, les polymorphismes étudiés sont 3 polymorphismes des introns 5, 3 et 17 (T-76A), C1236T et G2677W dont les fréquences sont respectivement de 0,17 ; 0,01 ; 0,28 ; 0,39 et 0,33. L'effectif étudié est petit (n=76 patients hétérozygotes pour une hypercholestérolémie familiale), il pourrait y avoir un manque de puissance des tests statistiques. Cependant, bien qu'ils n'observent rien de significatif avec C1236T et G2677W, les auteurs montrent que la présence d'une copie de l'allèle le plus rare pour T-76A est significativement associée avec une plus faible réduction du LDL après traitement par fluvastatine. A partir de ces 5 polymorphismes, ils estiment que 12 haplotypes sont présents. Dans un modèle additif, l'haplotype «int5G-1236C-int13C-(-)76T-2677W », dont la fréquence est de 19,5%, est associé avec une augmentation de la réponse au niveau des LDL (c'est à dire une baisse plus forte des LDL). Cet haplotype semble expliquer 6,5% de la variation de la réponse au LDL contre seulement 5,4% pour l'IMC, l'âge et le sexe. De plus, l'haplotype le moins fréquent, « TTCAG » (6%) est associé à une diminution de la réponse aux triglycérides. Cet haplotype semble expliquer 12% de la variation de la réponse aux triglycérides contre seulement 2,2% pour l'IMC, l'âge et le sexe [93]. Finalement, ces auteurs suggèrent qu'*ABCB1*, plus souvent considéré comme un modulateur de propriétés pharmacocinétiques, pourrait participer à la translocation des lipides à travers la membrane et moduler ainsi les propriétés pharmacodynamiques [93].

Enfin, Thompson JF et al., [94], ont génotypé 2735 individus traités par statines pour 43 SNPs de 16 gènes candidats, dont *ABCB1*, sélectionnés d'après leur effet supposé sur les lipides. Ils ont étudié la réponse au traitement : décroissance des LDL, du cholestérol total, des triglycérides et augmentation des HDL, en fonction des polymorphismes. Cet effectif beaucoup plus large permet selon les auteurs de trancher l'effet réel ou supposé d'un SNP. Parmi les 43 SNPs, les interactions les plus significatives avec la réduction du LDL sous atorvastatine sont avec le polymorphisme conduisant à l'ApoE2 (hétérozygotes diminution de 39,9% vs 36,4% pour les porteurs de l'allèle sauvage) et le polymorphisme G2677T d'*ABCB1*

(n=245 homozygotes pour l'allèle muté). Ils observent chez les homozygotes pour 2677W des diminutions du LDL et du cholestérol total plus faibles, de 3% et 2% respectivement, par rapport aux homozygotes pour l'allèle sauvage. Les porteurs de 3435T tendent également à avoir une réduction plus faible du LDL. Ceci va dans un sens opposé à ce qu'observent Kajinami et al., et Bercovitch et al.,. De plus, Kajinami et al., ne mettaient pas en évidence l'influence du polymorphisme 2677 (juste de l'haplotype 2677, 3435). Selon Thompson et al., ce manque de reproductibilité pourrait s'expliquer par les différences dans les populations étudiées, la longueur du traitement, la dose de statine et surtout la taille du groupe considéré. Enfin, il n'y a pas d'association apparente avec les polymorphismes G1199A et T3421A (Ser1141Thr, rs 17149694) d'*ABCB1*. Ces auteurs n'ont pas étudié l'effet des haplotypes ce qui malgré des effectifs élevés pourrait expliquer les différences observées avec Kajinami et al., par exemple. Les auteurs concluent cependant qu'aucune des associations observées ne peut prédire la réponse au traitement par atorvastatine de façon suffisante pour avoir un impact sur la décision thérapeutique en comparaison avec l'âge ou le sexe notamment [94].

(c) Susceptibilité à certaines pathologies

Enfin les polymorphismes d'*ABCB1* pourraient influencer la susceptibilité à certaines maladies [31, 59, 65, 68, 77]. Les polymorphismes du gène *ABCB1* pourraient provoquer une modification de sa fonction de protection de l'organisme et modèleraient la susceptibilité à certaines maladies. La plupart des études publiées concernent C3435T [31].

Les polymorphismes d'*ABCB1* influenceraient ainsi la susceptibilité aux maladies inflammatoires chroniques. L'association la plus constante étant celle entre l'allèle muté en C3435T et une augmentation du risque de maladie ulcérate (associations inconstantes avec la maladie de Crohn et avec le polymorphisme G2677T/A). Ces polymorphismes influenceraient également la résistance au traitement de ces pathologies par des glucocorticoides substrats d'*ABCB1* [95-98]. De plus, il a été montré que l'allèle 3435T aurait un rôle prédisposant pour la maladie de Parkinson [99], surtout si celle-ci fait suite à une exposition aux pesticides substrats d'*ABCB1* [100]. Ceci va dans le sens de l'observation que l'expression de l'ARNm d'*ABCB1* au niveau de la barrière hémato-encéphalique serait liée à l'étiologie et à la pathogenèse de troubles neurologiques comme Alzheimer et Parkinson [101]. Enfin, d'autres associations ont été observées. Par exemple, il a été montré que l'allèle muté 3435T est plus fréquent chez les patients atteints d'un carcinome rénal [102] et que

l'allèle muté en position -129 serait plus fréquent chez les patients souffrant de pathologies hématologiques malignes [103].

3) Haplotypes

Que ce soit au niveau des données d'expression ou d'activité ou des données de pharmacocinétique, la littérature n'a pas clarifié les associations entre génotypes et activité d'ABCB1 ; l'effet des polymorphismes étant souvent controversé d'une étude à l'autre [31]. Notamment, bien que C3435T ait été associé à des variations de la susceptibilité à certaines pathologies, à la pharmacocinétique de certains médicaments à l'expression de l'ARNm ou de la protéine d'ABCB1, toutes les études ne partagent pas ces observations. Cela s'expliquerait de plusieurs façons :

- problèmes de méthodologie et défaut de reproductibilité (effectif faible, absence de stratification des cas/contrôles sur l'ethnie ou différence de définition des phénotypes par exemple) décrits par Leschziner et al., [72] qui proposent une méthodologie de référence,
- interférences avec les facteurs de confusion tels que la co-médication avec des inducteurs ou inhibiteurs d'ABCB1 ou des pathologies associées,
- les substrats étudiés ont d'autres voies de métabolisme et de transport,
- variations interethniques de la fréquence des polymorphismes [31, 104]. Il peut donc y avoir des différences dans la réponse à un traitement ou dans la prévalence de certaines pathologies entre plusieurs ethnies. Par exemple, la fréquence de l'allèle sauvage C3435 est plus élevée chez les africains que chez les caucasiens ou les asiatiques. Il a été proposé que la fréquence plus élevée de CC observée chez les africains résulterait d'une sélection de l'avantage offert par ce génotype de protection contre les infections gastro-intestinales [31].

D'autre part, les associations contradictoires observées dans la littérature pour un SNP donné pourraient être dû à l'absence de prise en compte de l'effet d'autres polymorphismes [105]. En effet, de nombreux polymorphismes d'*ABCB1* sont en déséquilibre de liaison (DL). Un haplotype est un système intégré prenant en considération une combinaison de plusieurs mutations. Il serait donc plus pertinent d'étudier un haplotype plutôt que des SNPs isolés, surtout pour les gènes très grands et très polymorphes comme *ABCB1*, pour prédire les conséquences fonctionnelles [106]. Ainsi, C3435T est en DL significatif avec C1236T et

G2677T [74]. Quand on considère les combinaisons possibles de ces 3 polymorphismes, il apparaît qu'au moins 50% des individus ont un fort DL à ces 3 loci [31]. De plus, T-129C serait lui aussi en DL avec G2677T/A et C3435T [107]. Certaines études suggèrent donc que l'analyse d'haplotype basée sur T-129C, C1236T, G2677T/A et C3435T serait un meilleur prédicteur des phénotypes et des réponses au traitement que l'étude des SNPs isolés [74]. Il faut noter que la distribution des haplotypes et leur nombre total varie grandement entre les ethnies [77, 106]. Ces auteurs ont en effet défini 33 haplotypes fréquents à partir des variants de ABCB1 mis en évidence dans un échantillon de 245 ADN issus d'individus d'origines ethniques différentes. Il y a 2 haplotypes majeurs qui diffèrent au niveau de 6 sites. L'haplotype *ABCB1**13 contient 3 variants au niveau de régions codantes (1236T, 2677T et 3435T) et 3 variants introniques (intron 13(+24)T, intron9(-44)G et intron 14(+38)G) par rapport à l'haplotype *ABCB1**1 dit de référence. *ABCB1**1(C1236-G2677-C3435) est le plus fréquent dans les populations afro-américaines tandis qu'il est trouvé deux fois moins que l'haplotype *ABCB1**13 chez les caucasiens. L'idéal est de trouver le nombre minimum de polymorphismes à utiliser dans un haplotype qui soit l'haplotype le plus prédictif de l'effet observé (*haplotypes Tag SNPs*) [106]. A noter, cet haplotype pourrait être encore plus informatif en combinant les polymorphismes d'autres gènes tels que *CYP3A4* [106].

D. Régulation de l'expression du gène *ABCB1*

La variabilité de l'expression des enzymes et des transporteurs du métabolisme des médicaments, dont ABCB1, est modulée à deux niveaux. Tout d'abord, par des facteurs génétiques tels que les polymorphismes comme nous l'avons vu précédemment. Ensuite, par des facteurs non génétiques incluant les facteurs environnementaux (médicaments, polluants, alimentation), le sexe, l'âge, la physiologie (grossesse, hormones), les pathologies (inflammation, atteinte hépatique) et le tissu concerné. Les transporteurs membranaires étant impliqués dans l'élimination ou l'absorption de divers composés, il semble important d'étudier la régulation de leur expression aussi bien en ARNm qu'en protéine. En effet de cette régulation peut dépendre une modification du transport de certains substrats et donc de leurs paramètres pharmacocinétiques, la survenue de chimiorésistance ou de pathologies.

1) Mécanismes de régulation

Chez l'homme, il y a une grande variabilité interindividuelle de l'expression d'ABCB1. Dans le foie, les concentrations rapportées peuvent varier d'un facteur 50 [70]. ABCB1 est exprimé de façon constitutive dans de nombreux tissus mais peut aussi être induit par des facteurs tels que [28] :

- des signaux de stress (protéines de choc thermique, métaux),
- des molécules de l'inflammation (cytokines),
- des signes d'hypoxie,
- des médicaments (agents anticancéreux ...),
- des radiations UV, des radicaux libres ou des gènes suppresseurs de tumeur.

L'induction correspond à une augmentation de la quantité d'une protéine enzymatique suite à différents mécanismes (et inversement pour l'inhibition) : l'augmentation de la transcription, la diminution de la vitesse de dégradation de l'ARNm ou de la protéine ou l'augmentation de la stabilité de l'ARNm ou de la protéine. L'induction ou l'inhibition d'ABCB1 a des implications importantes au niveau clinique en termes d'efficacité et de toxicité de traitements [31]. De plus de nombreux médicaments inducteurs ou inhibiteurs d'ABCB1 (de façon dose-dépendante) peuvent être également des substrats d'ABCB1 (Tableau VIII). De nombreuses interactions médicamenteuses (notamment avec la digoxine) ont été liées à une inhibition d'ABCB1 par le vérapamil, la quinidine ou l'amiodarone ou à une induction par la rifampicine par exemple.

Tableau VIII : Substrats, inducteurs et inhibiteurs exogènes du transporteur ABCB1 [31].

<i>Drug</i>	<i>Substrate</i>	<i>Inhibitor</i>	<i>Inducer</i>
Anticancer agents			
Actinomycin D	✓		
Daunorubicin	✓		
Docetaxel	✓		
Doxorubicin	✓		
Etoposide	✓		
Imatinib	✓		
Irinotecan	✓		
Mitomycin C	✓		
Mitoxantrone	✓		
Paclitaxel	✓		
Teniposide	✓		
Topotecan	✓		
Vinblastine	✓		
Vincristine	✓		
Antihypertensive agents			
Carvedilol		✓	
Celiprolol	✓		
Diltiazem	✓		
Losartan	✓		
Nicardipine		✓	
Reserpine		✓	
Talinolol	✓		
Antiarrhythmics			
Amiodarone		✓	
Digoxin	✓		
Propafenone		✓	
Quinidine	✓	✓	
Verapamil	✓	✓	
Glucocorticoids			
Aldosterone	✓		
Cortisol	✓		
Dexamethasone	✓		✓
Methylprednisolone	✓		
Others			
Atorvastatin	✓	✓	
Bromocriptine		✓	
Colchicine	✓		
Dipyridamole		✓	
Emetine		✓	
Fexofenadine	✓		
Ivermectin	✓		
Loperamide	✓		
Mefloquine	✓	✓	
Progesterone		✓	
Retinoic acid			✓
Rhodamine 123	✓		
Spirolactone		✓	
Terfenadine	✓		
Vecuronium	✓		
Antiviral agents			
Amprenavir	✓		✓
Indinavir	✓	✓	✓
Nelfinavir	✓	✓	✓
Ritonavir	✓	✓	✓

<i>Drug</i>	<i>Substrate</i>	<i>Inhibitor</i>	<i>Inducer</i>
Saquinavir	✓	✓	✓
Antibiotics			
Clarithromycin		✓	
Erythromycin	✓	✓	
Levofloxacin	✓		
Rifampin	✓		✓
Sparfloxacin	✓		
Tetracycline	✓		
Antimycotics			
Itraconazole	✓	✓	
Ketoconazole		✓	
Immunosuppressants			
Cyclosporine	✓	✓	
Sirolimus	✓	✓	
Tacrolimus	✓	✓	
Valspodar	✓	✓	
Antidepressants			
Amitriptyline	✓		
Fluoxetine		✓	
Paroxetine		✓	
Sertraline		✓	
St John's wort			✓
Neuroleptics			
Chlorpromazine		✓	
Flupenthixol		✓	
Phenothiazine			✓
Antiepileptics			
Phenobarbital	✓		
Phenytoin	✓		
Antiacids			
Cimetidine	✓		
Ranitidine	✓		
Opioids			
Methadone		✓	
Morphine	✓		✓
Pentazocine		✓	
Antiemetics			
Domperidon	✓		
Ondansetron	✓		

La figure 20 présente les sites de fixation de la région promotrice, et les facteurs de transcription associés, dont dépend la régulation de l'activité transcriptionnelle d'ABCB1.

La région régulatrice 5' non traduite du gène codant *ABCB1* présente de nombreux sites de fixation de ces facteurs qui peuvent intervenir dans :

- la transcription constitutive : élément Inr (pas de TATA box pour initier la transcription), éléments GC et CCAAT, domaine de liaison à la protéine suppresseur de tumeurs p53 (régulation négative de la transcription si p53 constitutive et positive si p53 mutée), domaine de liaison au complexe AP-1 (formé de membres des familles d'oncogène Fos et Jun),...
- la surexpression constitutive dans les cellules résistantes aux médicaments : éléments MED-1 et MEF-1,
- la répression constitutive (acétylation des histones, méthylation de l'ADN),
- l'induction : HSE (élément de réponse aux protéines de choc thermique), C/EBP (liaison de molécules de l'inflammation), GC (réponse à l'hypoxie) ou SXR (=PXR, liaison de médicaments) [108].

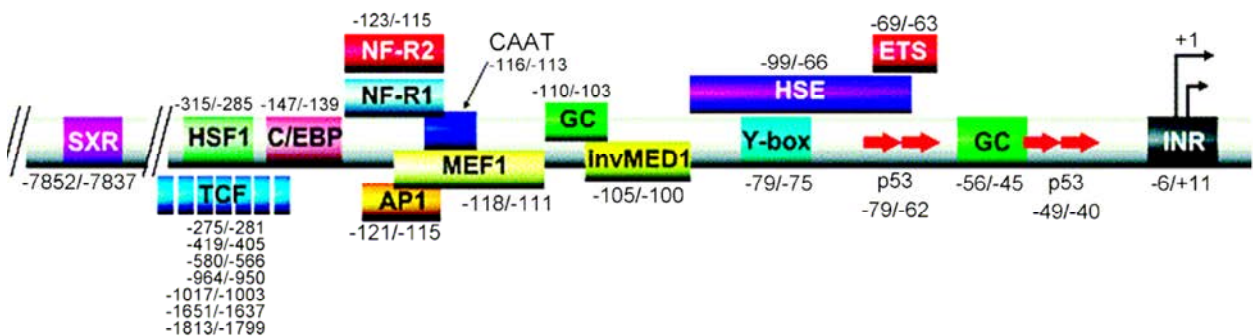


Figure 20 : Représentation schématique de la région 5' régulatrice du gène *ABCB1* avec les différents sites de fixation des facteurs de transcription [28]. SXR = PXR.

Parmi les facteurs qui se lient à cette région se trouvent Sp1, Sp3, Egr-1, WT-1, NF-Y, PCAF, P300, Ets-1, HIF-1, GC, TCF/LEF, IMED, MEF-1, SXR (=PXR), RXR, MeCP2, HSF1 et CEBP bêta [28, 108, 109].

2) Facteur de transcription PXR

La voie de régulation de l'expression d'ABCB1 la mieux étudiée est celle médiée par le facteur de transcription PXR (*Pregnane X Receptor*). Ce récepteur répondant aux prégnanes, est un membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins codé par le gène *NR1I2*. Il est également appelé récepteur aux stéroïdes et aux xénobiotiques (SXR) ou récepteur activé par les prégnanes (PAR). Ce facteur est activé par de nombreux ligands endo ou exogènes, ce qui entraîne la régulation de la transcription de nombreux gènes (Figure 21) dont ABCB1.

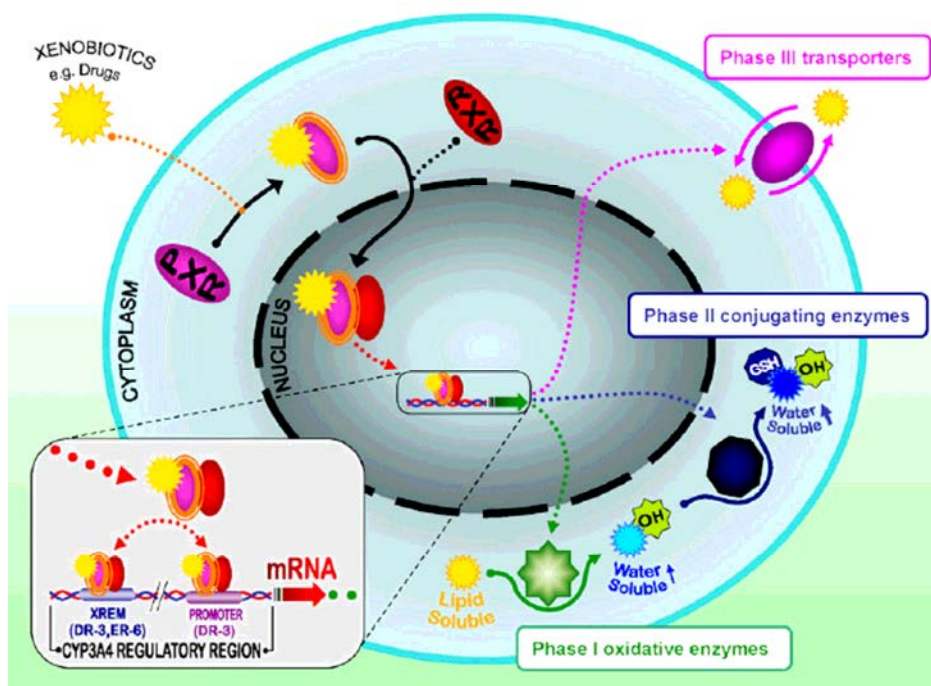


Figure 21 : Mécanisme d'action de PXR [110].

Après liaison du ligand endo ou exogène, PXR s'hétérodimérise avec le récepteur RXR α . Le complexe peut alors se lier à différents éléments de réponse, tels que ER6, DR4 et DR3, dans les régions régulatrices des gènes cibles [110].

L'analyse cristallographique de la poche de fixation du ligand a mis en évidence une cavité importante permettant l'interaction du récepteur PXR avec de nombreuses molécules hydrophobes [24]. Parmi les xénobiotiques agonistes figurent de nombreux médicaments dont des stéroïdes, des anticancéreux, des inhibiteurs de protéases, des antifongiques des glucocorticoïdes ou des anticonvulsivants [24]. La rifampicine, le clotrimazole, certaines statines ou la nifédipine sont également des agonistes de PXR [31, 70, 108]. Parmi les

composants endogènes figurent des hormones stéroïdiennes ou des stéroïdes neuro-actifs [110]. PXR participe également à l'homéostasie des lipides. En effet, la régulation physiologique des acides biliaires et du cholestérol est médiée par FXR et LXR qui ont pour ligands des oxystérols et des acides biliaires endogènes. Dans certaines situations physiopathologiques, lorsque les taux de ces molécules sont élevées, PXR peut lier ces mêmes molécules, bloquer la production d'acides biliaires à partir du cholestérol et induire les voies de métabolisme et de transport d'acides biliaires et d'oxystérols (induisant notamment la répression de CYP7A1, une enzyme clé du métabolisme du cholestérol) [110].

PXR est un régulateur majeur de la transcription de nombreuses enzymes et protéines impliquées dans les phases I, II et III du métabolisme et du transport des médicaments dont ABCB1 [24, 110, 111]. Concernant la phase I, PXR régule par exemple chez l'homme la transcription de CYP3A4, CYP3A5, CYP2B et CYP2C. Concernant la phase II, PXR module notamment la transcription de l'UGT1A1 et des sulfotransférases. Enfin, PXR régule la transcription de transporteurs d'efflux tels que MRP2, 3 et 4 et de transporteurs d'influx tel que l'OATP. Lors des programmes de recherche de nouveaux médicaments, les systèmes de criblage visant à tester le potentiel agoniste de médicaments candidats représentent ainsi une part importante pour prédire les interactions médicamenteuses. PXR est donc un acteur clé du système adaptatif de défense contre les xénobiotiques. Il participe ainsi à la fois au métabolisme et à la clairance de nombreux xénobiotiques, notamment via CYP3A4 et ABCB1, mais également de composants endogènes lipophiles. De plus, étant donné son rôle dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et des acides biliaires, les agonistes de PXR pourraient être bénéfiques dans le traitement des troubles cardiovasculaires impliquant des concentrations supra physiologiques de métabolites endogènes potentiellement dommageables comme le cholestérol et les acides biliaires [110].

PXR est exprimé principalement dans le foie et dans l'intestin et dans une moindre mesure dans les reins et les poumons mais également dans d'autres organes tels que l'estomac, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) et au niveau de la barrière hémato-encéphalique [110]

PXR est crucial pour la régulation de l'expression d'ABCB1 dans le foie et dans l'intestin [31]. Il pourrait jouer un rôle également au niveau de la barrière hémato-encéphalique [112]. Cela n'est pas clair au niveau des PBMCs bien que l'expression de l'ARNm de PXR a été significativement corrélée avec l'expression d'ABCB1 dans les cellules du sang périphérique [113, 114]. La régulation de l'expression d'ABCB1 peut donc différer significativement d'un tissu à l'autre.

3) Facteurs de transcription CAR et NFκB

Le récepteur CAR (*Constitutive Androstane Receptor* ou NR1I3) est principalement exprimé dans le foie et l'intestin [115] mais également dans les PBMCs [116]. Ce récepteur orphelin est un activateur constitutif de l'élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE). De récentes études ont montré in vitro que l'artémisine et l'acide valproïque peuvent moduler l'expression d'ABCB1 dans le foie et l'intestin via CAR et l'élément de réponse DR4 présent dans la région promotrice d'*ABCB1* [117, 118].

L'action des cytokines a souvent été décrite comme passant par l'activation de la voie NFκB (*Nuclear Factor-kappa B*) qui jouerait un rôle dans la régulation de l'expression d'ABCB1 [119]. En effet, plusieurs équipes ont montré que le TNFα (*Tumor Necrosis Factor alpha*) entraîne chez le rat et la souris une induction de l'ARNm et de la protéine Mdr1b dans le foie. L'IL-6 (*Interleukin 6*) et l'IL-1β (*Interleukin 1 beta*) moduleraient également l'expression d'ABCB1 dans le foie mais avec des variations inter-espèces [120].

4) Autres niveaux de régulation

Certains modulateurs de la fonction d'ABCB1 pourraient agir à un niveau post-traductionnel [28]. De plus, l'existence de modifications épigénétiques de type acétylation des histones et méthylation de l'ADN dans les phénomènes de résistance acquise aux anticancéreux a également été décrite in vitro [28, 72].

E. Transporteur ABCB1 et métabolisme lipidique

De nombreuses études montrent des associations significatives entre polymorphismes d'*ABCB1* et réponse aux traitements médicamenteux [72] notamment la modulation de la baisse du cholestérol sous statines et l'hypercholestérolémie secondaire aux antirétroviraux. Des études récentes proposent qu'en plus de moduler la pharmacocinétique des statines et des antirétroviraux, les polymorphismes d'*ABCB1* pourraient expliquer une partie de l'efficacité ou des effets indésirables de ces molécules par un impact direct sur les taux de lipides indépendamment de la présence de ces médicaments [90, 92, 121]. Le rôle d'*ABCB1* dans le transport du cholestérol est toujours controversé à l'heure actuelle. En effet, la plupart des études ont été réalisées *in vitro* et nous manquons d'informations sur le rôle d'*ABCB1* dans l'absorption, la distribution ou le métabolisme du cholestérol *in vivo* [122]. Bien que le mécanisme en soit inconnu, de nombreux points supportent toutefois l'hypothèse selon laquelle l'un des rôles physiologiques du transporteur ABCB1 est le transport du cholestérol. Ces principaux arguments sont les suivants.

Premièrement, de nombreux transporteurs ABC, structurellement proches d'*ABCB1*, essentiellement des membres des sous-familles ABCA et ABCG, transportent le cholestérol [37, 39-41, 55, 123].

Deuxièmement, ABCB1 est responsable de l'efflux d'un très grand nombre de substances endogènes et celles-ci sont généralement lipophiles : lipides physiologiques comme des phospholipides (phosphatidylcholine), sphingolipides alimentaires (sphingosine), sphingomyéline, glucosylcéramide ou encore des hormones stéroïdiennes [20].

Troisièmement, ABCB1 serait exprimé dans des domaines particulièrement riches en cholestérol [37, 124]. En effet il a été localisé dans des microdomaines membranaires riches en lipides, notamment en cholestérol et en sphingolipides (d'où une augmentation de la rigidité par rapport aux domaines environnants de la membrane plasmique), les radeaux lipidiques et les cavéoles [124, 125]. Il serait également localisé dans d'autres domaines ; la proportion variant en fonction du type cellulaire et de la méthode de localisation utilisée [124].

Quatrièmement, la localisation, l'expression et les activités (ATP-ase et transport) d'ABCB1 sont influencés par la concentration intracellulaire en lipides, et particulièrement en cholestérol [37, 124]. Comme pour une grande partie des transporteurs ABC, le gène codant ABCB1 répond au cholestérol (*cholesterol responsive gene*). Ainsi, Troost et collaborateurs ont montré que la concentration en cholestérol plasmatique peut moduler *ex vivo* la localisation et l'activité du transporteur [126, 127]. Troost et al., [126] montrent ainsi que l'augmentation du taux de cholestérol cellulaire est liée à une augmentation de l'activité d'ABCB1 dans les cellules mononuclées du sang périphérique. La même équipe [127] montre, dans des cellules multi-résistantes surexprimant ABCB1, que les variations du taux de cholestérol cellulaire influencent la localisation et la fonction du transporteur ; ce qui pourrait d'ailleurs contribuer à la grande variabilité interindividuelle de son activité, observée *in vivo*. En effet, une déplétion en cholestérol cellulaire entraîne une relocalisation d'ABCB1 des membranes des radeaux lipidiques vers d'autres structures membranaires et réduit la fonction du transporteur. D'autres études ont confirmé que la surcharge ou la déplétion en cholestérol modulent l'expression d'ABCB1 [52] et son activité [42, 128-130]. Il n'est pas défini s'il s'agit d'un effet direct du cholestérol non estérifié au niveau membranaire ou d'un effet indirect médié par les microdomaines riches en cholestérol [124]. De plus, cela pourrait varier en fonction du type cellulaire et du substrat étudié [131].

Cinquièmement, de nombreuses études suggèrent un rôle direct d'ABCB1 dans le transport du cholestérol. Il pourrait induire *in vitro* la redistribution du cholestérol libre de la couche interne vers la couche externe de la bicouche lipidique [128] ou vers le reticulum endoplasmique [132] facilitant ainsi son estérification [133].

Comme d'autres transporteurs ABC, ABCB1 agirait comme une flippase pour transloquer de nombreux lipides tels que des phospholipides du feuillet interne de la membrane vers le feuillet externe [124, 134, 135]. ABCB1 pourrait également transloquer le cholestérol du feuillet interne vers le feuillet externe [37, 124, 128]. En effet, Garrigues et al., [124, 128] ont montré notamment que ABCB1 médie la translocation ATPase dépendante du cholestérol dans la membrane. ABCB1, par son activité de translocase du cholestérol, pourrait ainsi participer notamment à l'enrichissement en cholestérol des radeaux lipidiques et des cavéoles et à la stabilisation et à l'augmentation du nombre de cavéoles, régulant ainsi leurs fonctions physiologiques [128]. En plus de cette translocation de cholestérol localisée au niveau membranaire, ABCB1 pourrait également moduler les différentes étapes du trafic cellulaire du cholestérol. Cela concerne à la fois la biosynthèse endogène du cholestérol, le transfert du

cholestérol vers le réticulum endoplasmique (qui favorise son estérification), l'import de cholestérol exogène depuis les LDL par endocytose et l'export du cholestérol aux HDL [124, 128] (Figure 22). Garrigues et al., proposent ainsi que ABCB1 pourrait faciliter l'efflux du cholestérol des membranes cellulaires pour la formation des HDL, peut être en collaboration avec ABCA1, ou encore interférer avec l'import du cholestérol exogène ou enfin faciliter son efflux vers le réticulum où il sera estérifié [128].

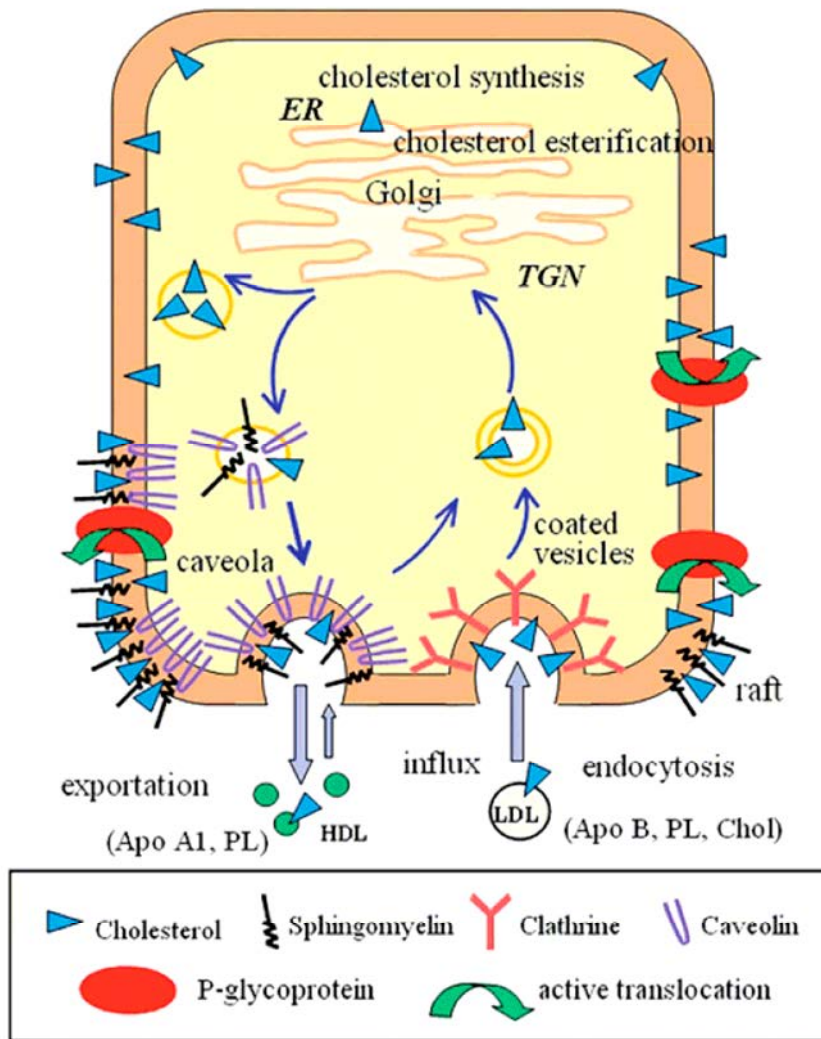


Figure 22 : Implication d'ABCB1 dans le trafic du cholestérol cellulaire [124].

Contrairement à Guarrigues et al., et Orłowski et al., [124, 128], pour d'autres auteurs, ABCB1 faciliterait plutôt la redistribution du cholestérol libre de la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique, favorisant ainsi son estérification. L'étape limitante de l'estérification du cholestérol est la disponibilité du cholestérol libre dans le réticulum endoplasmique qui est le site d'estérification du cholestérol par l'ACAT. Debry et al., [136]

ont été les premiers à suggérer un rôle d'ABCB1 dans l'estérfication du cholestérol. En effet, ils ont montré dans un ensemble de lignées cellulaires humaines que les inhibiteurs d'ABCB1 inhibent l'estérfication du cholestérol et que cette inhibition touche spécifiquement l'estérfication du cholestérol dérivé de la membrane. La même équipe a également démontré *in vitro* que l'activité d'ABCB1 est nécessaire à la biosynthèse du cholestérol et a proposé un modèle dans lequel ABCB1 est nécessaire au transport des stérols de la membrane plasmique vers le réticulum [137]. D'autres études vont dans le même sens. Luker et al., [131] ont déterminé le taux de cholestérol estérifié dans des cellules exprimant différents taux d'ABCB1. Ils ont montré qu'une augmentation de l'expression d'ABCB1 est corrélée à une augmentation de l'estérfication du cholestérol. Cependant, cet effet dépendrait du type cellulaire. Le mécanisme impliqué serait dissocié de l'activité de transport traditionnel d'ABCB1 [132]. De même Gayet et al., [129] ont observé une corrélation positive entre l'estérfication du cholestérol et le taux de chimiorésistance à la vinblastine de cellules humaines CEM dans lesquelles le phénotype MDR est lié exclusivement à ABCB1 à l'exclusion de tout autre transporteur. Enfin, Batetta et al., ont montré qu'il existe une corrélation positive entre le taux de cholestérol estérifié et l'expression de l'ARNm d'ABCB1 au niveau vasculaire [133].

Par contre, Issandou et al., [138] n'ont pas montré de corrélation entre l'activité d'ABCB1 et l'estérfication du cholestérol intracellulaire dans des cellules HepG2. Cependant, cela s'expliquerait par la présence de facteurs régulateurs supplémentaires. Parmi ces facteurs, la cavéoline-1, composant des cavéoles, médie l'efflux du cholestérol libre du réticulum vers la membrane plasmique (rôle opposé à ABCB1). La disponibilité du cholestérol libre dans le réticulum, déterminant majeur de l'activité de l'ACAT, serait ainsi régulée à la fois par ABCB1 et la cavéoline-1 et de manière opposée [121, 139]. En 2006, Le Goff et ses collaborateurs [140] ont réévalué *in vitro* le rôle d'ABCB1 dans l'homéostasie du cholestérol cellulaire. Ils observent une association entre l'efflux du cholestérol et l'expression d'ABCB1 dans les cellules surexprimant ABCB1 exclusivement. De plus, ils ne mettent en évidence aucune association entre l'expression d'ABCB1 et la concentration intracellulaire en cholestérol, l'import d'esters de cholestérol depuis les lipoprotéines ou l'activité de l'ACAT. Ils concluent que l'expression d'ABCB1 ne joue pas un rôle majeur dans l'homéostasie du cholestérol. Cependant, comme le souligne Leon et al., [122], Le Goff et al., ont sélectionné des cellules HeLa et des cellules de rein. Or ces cellules peuvent présenter des caractéristiques différentes des cellules intestinales ou macrophagiques. Leon et al., [122] proposent une synthèse de la littérature sur l'implication d'ABCB1 dans la mise à disposition du cholestérol

pour l'estérification. La revue de la littérature suggère qu'ABCB1 serait impliqué dans l'homéostasie cellulaire du cholestérol mais que nous manquons d'études *in vivo* concernant le rôle d'ABCB1 dans l'absorption, la distribution et le métabolisme du cholestérol pour le confirmer.

Sixièmement, ABCB1 pourrait réguler la réabsorption intestinale du cholestérol. Ainsi, Tessner et al., [141], ont montré *in vitro* que le taux d'expression d'ABCB1 dans des cellules intestinales peut influencer le taux de cholestérol absorbé via ces cellules. En effet, des cellules épithéliales d'intestin murin transfectées pour le gène *ABCB1* humain présentent une augmentation de l'expression de la protéine ABCB1 et de l'import de cholestérol par rapport à des cellules non transfectées. De plus, malgré une synthèse de cholestérol normale, les souris déficientes en *mdr1a* et *mdr1b* (équivalent d'ABCB1 chez l'homme) ont des concentrations plasmatiques en cholestérol plus faibles associées à une augmentation de la perte fécale de cholestérol, suggérant un rôle important d'ABCB1 dans la réabsorption du cholestérol [142, 143]. Tous et al., [144] ont utilisé un modèle d'inflammation induit par la turpentine chez des souris susceptibles à l'athérosclérose. Chez les souris traitées, bien qu'il y ait augmentation des marqueurs de l'inflammation, il y a diminution de la taille des lésions athérosclérotiques et diminution des lipides plasmatiques. De plus, la diminution du cholestérol plasmatique est corrélée avec une diminution concomitante de l'expression du gène *mdr1b* hépatique. Les auteurs proposent que l'expression plus faible d'ABCB1 contribue à expliquer le taux plus faible de cholestérol plasmatique chez les souris traitées, probablement par diminution de la réabsorption intestinale du cholestérol.

Enfin, septièmement, certaines études ont associé ABCB1 avec la susceptibilité aux maladies cardiovasculaires de type maladies vasculaires occlusives. L'estérification du cholestérol joue notamment un rôle dans la progression de l'athérosclérose via la formation des cellules spumeuses avec accumulation de cholestérol estérifié dans la cellule, moins de cholestérol libre transporté aux cavéoles pour excréation et donc une diminution des HDL, une augmentation de la prolifération de certains types cellulaires comme les cellules musculaires lisses vasculaires. Batetta et al., [133] observent des taux plus élevés d'esters de cholestérol, d'ARNm d'ACAT et d'ARNm d'ABCB1 et des taux plus faibles d'ARNm de cavéoline-1 dans des segments athérosclérotiques de la paroi vasculaire artérielle. Postulant un rôle d'ABCB1 dans l'estérification du cholestérol, ces auteurs proposent qu'une augmentation de l'expression d'ABCB1 conduit à une accumulation d'esters de cholestérol intracellulaires au

niveau de sites sujets à l'athérosclérose [139, 145]. De plus, les résultats de Batetta et al., [139] supportent l'hypothèse que l'estérfication du cholestérol accélérât la progression des maladies vasculaires en modulant la prolifération des cellules musculaires lisses. Ce que confirme Tous et al., [144] dans un modèle murin susceptible à l'athérosclérose (souris déficientes en ApoE). En effet, ces auteurs montrent qu'en réponse à une inflammation chronique locale, il y a une diminution relative de l'expression hépatique du gène *mdr1b* et une diminution des concentrations plasmatiques en cholestérol. Malgré l'augmentation des marqueurs plasmatiques de l'inflammation, cette combinaison de facteurs induit une diminution significative de la taille des lésions athérosclérotiques [144].

IV. Modèle d'étude : le tissu hématopoïétique

Le sang est fréquemment utilisé pour l'étude de nombreux phénotypes. Or, seules certaines enzymes de phase II sont solubles et donc mesurables comme phénotypes dans le plasma ; la majorité des EMXT n'étant pas excrétées. Les transporteurs ABC en particulier sont transmembranaires. Nous avons donc été amenés à choisir un modèle tissulaire et nous avons sélectionné les leucocytes. Bien que l'expression dans les cellules mononuclées issues du sang périphérique ou PBMCs (*Peripheral Blood Monocuclear Cells*) soit faible comparativement à des tissus comme le foie, ces cellules restent d'intérêt pour mesurer et étudier l'expression de ces protéines [113, 146-148]. Les principales raisons en sont les suivantes [149, 150] :

- ces cellules circulantes sont facilement obtenues par une prise de sang. Elles forment un tissu bien plus accessible que des tissus cibles comme le foie, le tissu adipeux ou les cellules endothéliales. Ce sont les seules cellules que l'on peut concevoir d'obtenir dans une population de fort effectif de sujets sains ou malades,
- elles sont dites « sentinelles » car elles atteignent facilement tous les organes dont ceux pathogènes comme l'endothélium vasculaire. Elles sont donc informatives dès le début d'une pathologie,
- ce sont des cellules clés dans les pathologies cardiovasculaires notamment via leur implication dans les voies de l'inflammation,
- bien qu'elles présentent une grande variété de types cellulaires, chaque type possède des marqueurs de surface qui lui sont spécifiques et permettent de le purifier aisément,
- enfin, les leucocytes exprimeraient de façon significative environ 80% des gènes chez l'homme et les réponses aux modifications physiopathologiques ou environnementales seraient visibles au niveau du profil d'expression des gènes dans ce tissu.

Parmi ces gènes, les leucocytes expriment une grande variété d'EMXT y compris des CYPs, des enzymes de phases II et des transporteurs de phase III dont ABCB1 [146-148, 151-175]. Quelques études ont montré que les leucocytes expriment également les facteurs de transcription dont AHR et ARNT (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) [159, 166, 167, 171] ou PXR [113, 114]. De plus, la régulation de l'expression des EMXT par ces facteurs de transcription serait conservée dans les PBMCs [113, 167] (Tableau IX).

Tableau IX : Enzymes du métabolisme des xénobiotiques et facteurs de transcription présents dans les PBMCs de sujets sains [23].

Authors, Year	Cell Type	Blood Quantities	Number of Healthy Subjects	Phenotype	Inducing Compounds	DME and TF
Raucy et al., 1997	Lymphocytes	320	22	Immunoblot (microsomes) RT-PCR Chlorzoxazone – clearance	Alcohol	CYP2E1
Baron et al., 1998	Monocytes and culture		10	RT-PCR Immunoblot <i>p</i> -Nitrophenol hydroxylase	Benanthracene Dexamethasone Cyclosporine Phenobarbital Tetradecanoyl-phorbol Liposaccharide	CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6, CYP2E1, CYP3A3/4
Dassi et al., 1998	PBMC	?	75	RT-PCR	Tobacco	CYP1B1
Spencer et al., 1999	PBMC and culture	60	10	RT-PCR	Dioxins	CYPB1
Stärkel et al., 1999	Neutrophils and lymphocytes	100	8	Immunoblot 6 β OH-cortisol	Rifampicin	CYP3A
Takeda et al., 1999	PBMC	?	10	RT-PCR Southern blot		CYP11B2
Boucher et al., 2000	PBMC	?	17	Flow cytometry RT-PCR	Fat diet	CYP2E1 protein and mRNA
Krovat et al., 2000	PBMC	40	10	RT-PCR		CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, epoxide hydrolase, CYP2F1 (very low)
Nakamoto et al., 2000	Lymphocytes	10	8	RT-PCR	Rifampicine 3 weeks (tuberculosis)	CYP3A4
Nguyen et al., 2000	PBMC	?	10	DNA arrays	Interferon	CYP4A11, CYP2J2, CYP2E1, CYP2A6, CYP1A1, CYP2B6, CYP4B1, CYP2C8, CYP3A, CYP1B1, CYP2C9, CYP2C19
Smart and Daly, 2000	PBMC and culture	20	30	EROD assay Immunoblot		CYP1A1, AHR
Finnström et al., 2001	Leucocytes	?	13	RT-PCR		CYP2E1, CYP1B1, CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4
Hannon-Fletcher et al., 2001	Lymphocytes	15	8	Immunoblot (microsomes)	(Diabetes)	CYP2E1
Asghar et al., 2002	PBMC	25	50	RT-PCR	Rifampicin	CYP2C8, CYP2E1, CYP3A5, CYP3A7, CYP4A11, CYP4B11, ABCB1
Finnström et al., 2002	Leucocytes	?	19	RT-PCR		CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A4
Carcillo et al., 2003	PBMC	8	9	Debrisoquine clearance RT-PCR		CYP2D6
Gashaw et al., 2003	Leucocytes	8	96	RT-PCR Alprazolam clearance	Rifampicin 5 days	CYP3A4
Landi et al., 2003	PBMC and culture	50	62/59	RT-PCR EROD assay	Dioxins	AHR, CYP1B1, ARNT, and CYP1A1 only after cultures
Lin et al., 2003	PBMC and culture	20	32	RT-PCR	Benanthracene Tobacco	CYP1A1, CYP1B1, AHR, ARNT
Toide et al., 2003	Leucocytes		72	RT-PCR	Dioxins	CYP1B1
Tuominen et al., 2003	PBMC	8	16	RT-PCR	Formylindolocarbazole	CYP1A1, CYP1B1
Furukawa et al., 2004	Buffy coat	10	20	RT-PCR	(Cancer)	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2E1
Lampe et al., 2004	PBMC	10	85	Microarrays	Tobacco	CYP1B1
Yamamoto et al., 2004	PBMC	?	13	RT-PCR	Methylcholanthrene	CYP1A1, AHR, AHR repressor gene, ARNT
Haas et al., 2005	Lymphocytes	8	12	Caffeine, debrisoquine, omeprazole, midazolam clearances RT-PCR	Rifampicin	CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C19 (very low)
Landi et al., 2005	PBMC and culture	50	62/59	RT-PCR EROD assay	Dioxins 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin/nitrogen	CYP1A1, CYP1B1
Liangpunsakul et al., 2005	PBMC	25	20	RT-PCR	Alcohol	CYP2E1, CYP3A4
Miura et al., 2006	PBMC culture	?	7	RT-PCR	Angiotensin II	CYP11B2 and mineralocorticoid receptor

Pour l'étude du transcriptome associé au métabolisme lipidique, quelques auteurs se sont déjà servis avec succès du modèle PBMC. Par exemple, Wibaut-Berlaimont et al., ont montré à l'aide d'une puce d'expression que l'atorvastatine régule l'expression de gènes associés à l'hémostase, l'inflammation et l'apoptose dans les PBMC de sujets hyperlipémiques avant même qu'un changement du profil lipidique soit visible dans le sang [176]. De même, Ma et al., [177] ont récemment étudié à l'aide d'une puce le profil d'expression de nombreux gènes dans les PBMCs de sujets sains en rapport avec les concentrations en lipides plasmatiques. Sachant que les lipides plasmatiques représentent un facteur de risque cardiovasculaire majeur et que l'inflammation a été reconnue ces dernières années comme aillant un rôle majeur dans ces pathologies, leur but était d'étudier les relations entre lipides plasmatiques et leucocytes en analysant le profil d'expression dans les leucocytes en fonction des concentrations en lipides plasmatiques [177]. Ils mettent en évidence différents profils intéressants qui suggèrent que les leucocytes répondent aux changements de concentrations en lipides plasmatiques en régulant certains groupes de gènes dont les gènes impliqués dans la réponse immunitaire et dans le métabolisme des lipides et des acides gras. Ils montrent ainsi que l'expression :

- de nombreux gènes liés à l'inflammation et à la réponse immunitaire sont associés au taux de lipides plasmatiques,
- des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et dans la chaîne de transport d'électrons est positivement corrélée avec le taux de triglycérides et de LDLc et négativement avec les HDLc,
- des gènes impliqués dans l'agrégation plaquettaire est négativement corrélée avec les taux de HDL,
- des facteurs de transcription régulant les gènes impliqués dans la lipogenèse est corrélée avec les taux de lipides plasmatiques,

Enfin, de nombreux gènes associés aux taux de lipides plasmatiques sont localisés dans des régions (quantitative trait loci) connues pour être associées à l'hyperlipémie.

Les leucocytes issus du sang périphérique sont constitués de polynucléaires et de cellules mononuclées incluant lymphocytes et monocytes. Parmi ces cellules, les 2 types les plus intéressants sont les lymphocytes et les monocytes. En effet, ces types cellulaires sont des outils et des cibles idéaux pour étudier les relations entre EMXT et les voies métaboliques de

la physiopathologie cardiovasculaire. Ils jouent un rôle non négligeable dans l'initiation et le développement des pathologies cardiovasculaires.

Au cours du 3^e point du recrutement de la cohorte STANISLAS, une banque de PBMCs a été réalisée à partir d'un tube de sang total et nous servira de matériel de travail. La technique d'isolement par Salting-out assure un bon rendement en lymphocytes T essentiellement avec moins de 5% de lymphocytes B et moins de 5% de monocytes. A noter, si un nouveau point de recrutement de la cohorte STANISLAS est proposé, l'extraction des monocytes pourrait être envisagée. En effet, bien qu'ils présentent les inconvénients d'être moins abondants et plus difficiles à extraire que les lymphocytes, ils représentent un groupe cellulaire plus homogène et sont des modèles classiques d'étude dans le domaine lipidique.

En résumé, de nombreux enzymes du métabolisme des xénobiotiques et transporteurs présentent un intérêt certain dans le domaine cardiovasculaire que ce soit au niveau physiopathologique ou au niveau pharmacotoxicologique. Le transporteur ABCB1 en particulier a suscité notre attention pour son rôle dans le métabolisme des médicaments hypolipémiants et pour son implication éventuelle dans l'homéostasie lipidique. Afin d'évaluer si ce transporteur pourrait être proposé comme un nouveau marqueur du risque cardiovasculaire, nous avons souhaité réaliser une analyse génomique et transcriptomique de ce transporteur dans un modèle d'intérêt : les cellules mononuclées du sang périphérique.

Nous allons maintenant décrire le matériel et les méthodes utilisés dans ce travail afin d'atteindre notre objectif. Nous présenterons les populations étudiées. Puis nous décrirons les techniques de biologie moléculaire utilisées afin de réaliser les analyses génomique et transcriptomique. Nous détaillerons brièvement les techniques de culture cellulaire abordées et nous finirons par décrire les analyses statistiques effectuées.

MATERIEL & METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. Populations étudiées

Au cours de notre travail de thèse, nous avons été amenés à travailler sur 2 populations : une cohorte familiale avec un suivi longitudinal ; la cohorte STANISLAS ; et une étude transversale de témoins et de cas hypertendus-diabétiques.

A. Cohorte STANISLAS

La cohorte STANISLAS (Suivi Temporaire Annuel Non Invasif de la Santé des Lorrains Assurés Sociaux) est une cohorte familiale longitudinale recrutée au Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre-lès-Nancy. Cette cohorte est composée de 1006 familles, soit 4295 individus recrutés dès 1994 (A0). Ces familles sont revenues 5 ans (A5), puis 10 ans (A10), plus tard. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer le rôle et la contribution de facteurs génétiques et environnementaux au risque cardiovasculaire. Ses caractéristiques ont été décrites par Siest et al., [178]. Brièvement, elle inclut des familles lorraines d'origine européenne composée de deux parents et d'au moins 2 enfants biologiques âgés de plus de 6 ans qui ont été invités par la Caisse Primaire d'Assurance Maladie à venir passer un examen de santé. Chaque individu était supposé sain et indemne de toute pathologie aigüe ou chronique à l'inclusion. Cette étude a été approuvée par le comité local d'éthique de Nancy et chaque participant a signé un formulaire de consentement.

Pour l'analyse génétique, nous avons sélectionné un sous-groupe de 371 individus de la cohorte STANISLAS sur 3 critères :

- présence au 2^e point de recrutement,
- absence de thérapeutiques cardiovasculaires,
- exclusion des individus traités par hypolipémiants et hypoglycémisants afin de ne pas biaiser nos tests.

Pour l'analyse transcriptomique, nous avons retenu 83 sujets sur les critères suivants :

- présence au 3^e point de recrutement (seul point pour lequel nous disposons d'une banque de lymphocytes permettant l'extraction d'ARN),
- Absence de tabagisme actif ou de consommation élevée d'alcool (>32g/jour),
- bilans cliniques et biologiques complets.

Nous avons utilisé les résultats du deuxième bilan de santé pour l'analyse génomique et du troisième bilan pour l'analyse transcriptomique.

B. Population de l'étude HYDROGENE

L'étude HYDROGENE (HYpertension et Diabète : Recherche des Origines GENEtiques) est une étude cas-témoins prospective conduite par le Centre d'Investigation Clinique de Nancy et terminée en 2002. Son objectif était d'étudier l'influence combinée de l'hypertension artérielle (HTA) et du diabète sur le remodelage artériel et cardiaque évaluée d'une part par les traits phénotypiques de la structure et de la fonction artérielle et de la matrice extracellulaire et d'autre part, par des marqueurs génotypiques, tout en tenant compte des interactions gène-environnement. Le recrutement des patients hypertendus-diabétiques et des contrôles a été effectué entre 1997 et 2000. Parmi les 113 cas et les 126 témoins prospectés, 64 cas et 92 témoins ont été inclus au final. Ces personnes ont donné leur consentement éclairé écrit et l'investigateur et le patient en ont rapporté l'acceptation sur le formulaire de recueil du consentement. La sélection des patients s'est fait sur les critères suivants :

Critères d'inclusion

- Patients de sexe féminin ou masculin, entre 18 et 75 ans,
- Patients présentant une HTA définie par une pression artérielle diastolique (PAD) > 85mmHg et / ou une pression artérielle systolique (PAS) >130 mmHg sans traitement antihypertenseur, ou patients recevant un traitement antiHTA depuis moins d'un an, quelle que soit sa nature, quels que soient les chiffres de pression artérielle,
- et un diabète non insulino-dépendant équilibré (Hémoglobine A1C < 9%) quel que soit le traitement du diabète selon les critères du *National Diabetes Data Group* (USA).

Critères de non-inclusion

- Femmes enceintes ou allaitantes,
- HTA secondaire,
- Hypertension artérielle maligne ou sévère (PAD >120 mmHg),
- Traitement antiHTA depuis plus d'un an,
- Insuffisance rénale (créatininémie >25mg/l),
- Kaliémie > 5 mmol/l ou natrémie < 125mmol/l,
- Diabète insulino-dépendant, ou non insulino-dépendant NON équilibré (Hb A1C >9%),
- Dyslipidémie non traitée (LDL Cholestérol >1,60 g/l, triglycérides >3 g/l),
- Obésité avec un indice de masse corporelle (IMC)>40
- Insuffisance cardiaque décompensée ou mal équilibrée,
- Absence de recueil du consentement éclairé, écrit et signé,
- Antécédents d'alcoolisme, de toxicomanie, des troubles psychiatriques,
- Personnalité opposante, faible motivation ou tout autre problème d'ordre émotionnel ou intellectuel pouvant invalider le consentement ou limiter les possibilités du patient à se plier aux exigences du protocole.

Le groupe contrôle est composé de sujets sains, sans HTA ni diabète, issus de la population lorraine, de 18 à 75 ans, appariés aux cas pour l'âge et le sexe. Les critères d'exclusion étaient : hypertension, antécédents familiaux de maladies cardiovasculaires, maladie systémique, prise de médicaments pouvant interférer avec l'épaisseur de la paroi de la carotide.

II. Paramètres cliniques et biologiques

De nombreux paramètres ont été relevés au cours de l'examen de santé de la cohorte STANISLAS ou au cours de l'étude HYDROGENE.

A. Données cliniques

En plus de l'âge, différentes données anthropométriques ont été évaluées dont l'indice de masse corporelle. Les antécédents personnels et familiaux, la consommation d'alcool, de

tabac et/ou de médicaments ont été recueilli à l'aide de questionnaires remplis par le participant ou par le personnel qualifié.

B. Dosages biologiques

Les prélèvements sanguins ont été réalisés chez des sujets à jeun sur quatre tubes Vacutainer (Becton Dickinson, Grenoble, France). Deux sont des tubes secs avec gel séparateur. Ils sont centrifugés à 1500g pendant 15 minutes puis servent immédiatement aux dosages biochimiques ou sont conservés en paillette à -196°C dans l'azote liquide pour dosages ultérieurs. Deux autres sont des tubes EDTA qui permettent après centrifugation 10 minutes à 1000g de récupérer à la fois le *buffy coat* (qui servira à l'extraction de l'ADN) et le plasma.

Le cholestérol total, HDL et LDL, les triglycérides et les apolipoprotéines A1, B, C3 et E ont été déterminés à A0, A5 et A10. Le cholestérol total a été dosé par une méthode enzymatique (CHO/PAD, Merck) sur l'AU 640 (Olympus, Rungis, France). Les triglycérides sont dosés par le même appareil grâce à d'autres réactions enzymatiques utilisant la GPO et la PAP (Boehringer). Le HDL a été dosé comme le cholestérol total après précipitation au phosphotungstate des lipoprotéines contenant l'ApoB (Cobas-Mira, Roche Diagnostics, Bâle, Suisse). Le LDL a été calculé pour des concentrations en triglycérides inférieures à 4g/L grâce à la formule de Friedewald [179] ($LDL = \text{cholestérol total} - HDLc - TG/5$). L'apoA1 et l'apoB ont été dosées par immunonéphéométrie (BNII, Dade Behring, Marburg, Allemagne), l'apoC3 et l'apoE par immunoturbidimétrie (Cobas-Mira, Roche Diagnostics, Bâle, Suisse).

III. Analyses génétiques

A. Extraction de l'ADN génomique

Le sang fraîchement prélevé sur tube EDTA est centrifugé 10 minutes à température ambiante (1000g) pour obtenir le *buffy coat*, c'est-à-dire la fraction de leucocytes et de plaquettes qui surnagent entre globules rouges et plasma. Puis l'ADN génomique est extrait à partir de ce *buffy coat* par la technique de Miller [180] et conservé à -80°C (-20°C pour les solutions de travail).

Le principe de la technique de Miller est celui d'un « *salting out* », c'est à dire d'une déshydratation suivie d'une précipitation des protéines par une solution de chlorure de sodium saturée. L'ADN est ensuite précipité par de l'éthanol puis repris en suspension. Le protocole utilisé est le suivant :

- Préparation des solutions de travail

Les tampons de lyse et d'extraction (TE) sont filtrés sur membrane et stérilisés en autoclave 45 minutes à 121°C. Une solution de protéinase K à 1mg/ml est également préparée.

- Dégradation des protéines et des membranes

L'extraction peut être réalisée à partir de 2 mL minimum de « *buffy coat* ».

- Ajouter à chaque tube 3 ml de tampon de lyse, 1 ml de protéinase K [1mg/ml] et 200 µl de détergent anionique SDS 10%,
- Incuber 16 heures à 37°C sous agitation rotative. Dans un premier temps la solution de lyse et le SDS vont détruire les membranes. Dans un deuxième temps, la protéinase K va hydrolyser les protéines.

- Extraction de l'ADN par déshydratation et précipitation des protéines dégradées

- Ajouter par tube 2,4 ml de NaCl 6M et 3,4 ml de tampon de lyse et homogénéiser,
- Centrifuger 20 minutes, à 4°C, 1500g (CR3i, Jouan). La solution de NaCl saturée va provoquer une déshydratation des protéines, entraînant une interaction hydrophobe entre elles et leur précipitation.

- Précipitation de la pelote d'ADN (à partir de cette étape, travailler dans la glace)

- Transvaser délicatement le surnageant dans un tube de 50 ml contenant 15 ml d'éthanol absolu ayant passé une nuit à 4°C (éviter de prendre le précipité),
- Mélanger lentement par rotation afin de précipiter la pelote d'ADN,
- Récupérer la pelote à l'aide d'une pipette pasteur thermosoudée à son extrémité,
- Agiter doucement la pelote accrochée à la pipette Pasteur dans un tube contenant 10 ml d'éthanol à 70% ayant passé la nuit à 4°C afin de la rincer.

- Solubilisation de l'ADN

En tube Eppendorf dans 500 µl de TE par agitation rotative à 37°C pendant 24 à 48h.

- Détermination de la concentration en ADN

L'échantillon est dilué au 1/40^e et la lecture de la densité optique à 260 nm (DO₂₆₀) est effectuée grâce à un spectrophotomètre (Specord 205, Analytik Jena). La concentration de la solution mère (C) est donnée par la formule suivante (D =Facteur de dilution) :

$$C (\mu\text{g/ml}) = \text{DO}_{260} \times 50 \times D$$

Le rapport des $DO_{260/280}$ optimal, garant de la pureté de l'extraction, est situé entre 1,8 et 2,1.

Les échantillons sont ensuite dilués à 100 ng/ μ L avec du tampon d'extraction TE. Ces échantillons dilués constitueront la solution de travail (stockées à -20°C).

B. Techniques de génotypage

Afin de mener à bien ce travail, nous avons utilisé trois techniques de génotypage. La première est une PCR multiplex suivie d'une détection des allèles par révélation colorimétrique. Cette technique nous a permis de déterminer le profil génétique de lignées cellulaires pour de nombreux gènes d'intérêt dans le domaine cardiovasculaire. De plus, afin de déterminer les génotypes des individus pour des polymorphismes de transporteurs ABC nous avons utilisé une technique de PCR-RFLP et une technique plus complexe fondée sur la technologie TaqMan. Ces deux techniques ont été développées grâce à des collaborations avec le Dr Véra Ribeiro Marques (Faro, Portugal) et le Pr Gerd Schmitz (Regensburg, Allemagne).

1) PCR Multiplex-révélation colorimétrique

La technique Multiplex utilisée dans l'équipe a été développée conjointement avec les laboratoires Roche [181]. Ce système est une technique à haut débit qui permet de génotyper 78 individus en même temps pour 111 sites polymorphes de 65 gènes candidats. Elle consiste à amplifier simultanément plusieurs séquences de gènes différents grâce à des amorces biotinylées en 5'. La révélation se fait ensuite par une méthode de Dot-Blot inversée grâce à une réaction colorimétrique. Plusieurs systèmes ont été développés, permettant l'étude de marqueurs génétiques liés notamment au métabolisme des lipides (Multiplex IIA), à la pression artérielle, à la coagulation (IIB) et à l'inflammation (IIB, III).

(a) PCR

(i) Principe

La réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) classique permet d'amplifier rapidement une quantité donnée d'un fragment d'ADN précis grâce à un couple d'amorces encadrant spécifiquement la séquence à amplifier. Deux amorces (sens et antisens) s'hybrident à l'acide nucléique cible en présence de desoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) et de Taq polymérase qui synthétise le brin complémentaire.

Une PCR commence par une étape de dénaturation initiale, suivie d'une répétition d'un cycle de 3 phases et se termine par une étape d'élongation finale. Le cycle triphasique, répété 30 à 45 fois, est constitué des étapes suivantes (Figure 23) :

- Dénaturation de l'ADN bicaténaire en deux brins monocaténaires (95°C),
- Hybridation des amorces sur la cible. Cette étape conditionne la spécificité de l'amplification. La température de cette étape est spécifique à chaque protocole de PCR car elle dépend de la longueur des amorces et de leur composition en oligonucléotides. Il est recommandé de se placer à une température inférieure de 5°C à la température de fusion des amorces. En général, cette température est comprise entre 50 et 60°C,
- Elongation, c'est à dire synthèse d'un nouveau brin par la Taq polymérase à partir des amorces et de dNTP libres. Il en résulte deux ADN bicaténaires. Cette étape se déroule généralement à la température optimale à l'action de la polymérase : 72°C. Sa durée dépend principalement de la longueur de l'amplicon.

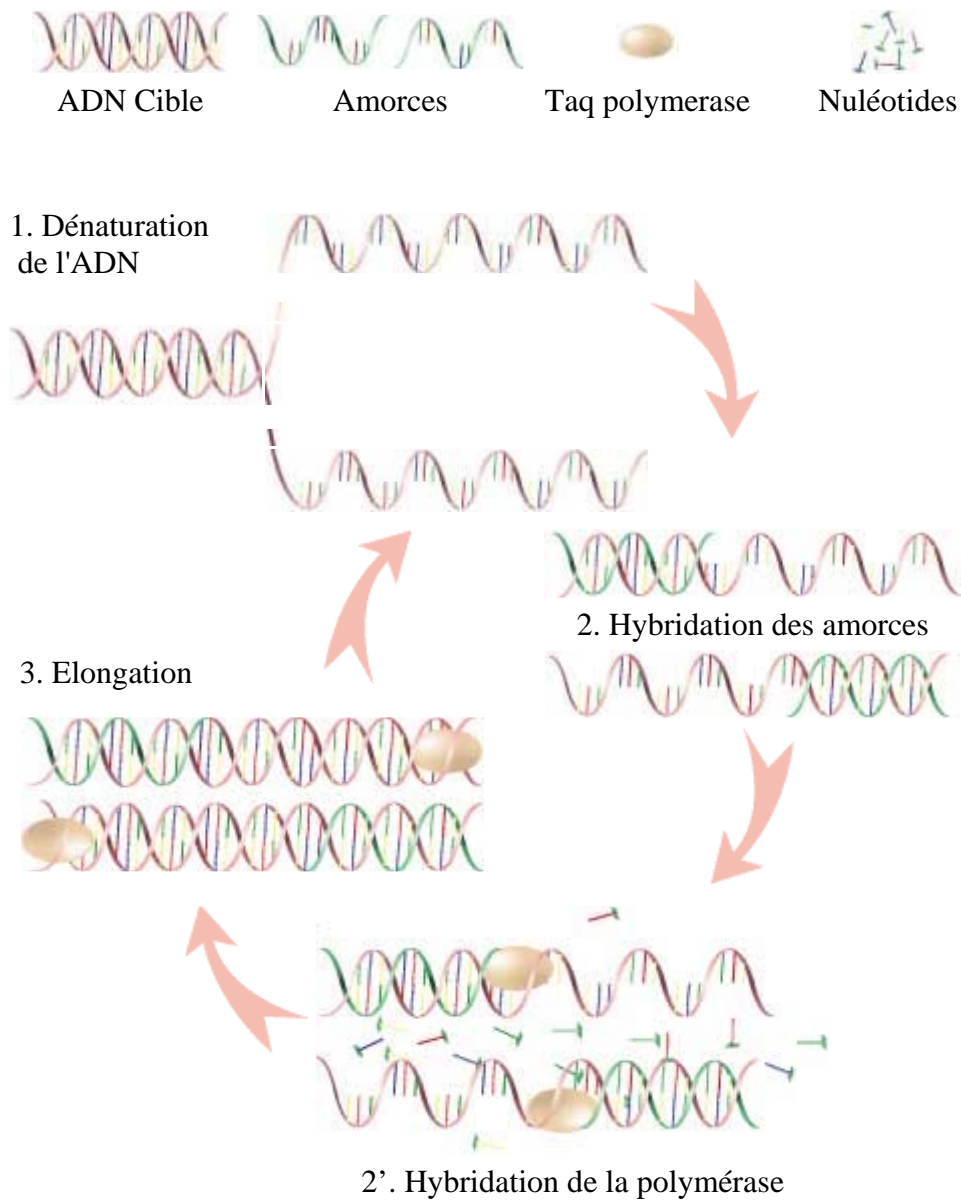


Figure 23 : Principe d'un cycle de PCR.

La PCR d'un système multiplex se différencie de la PCR classique par l'addition non pas d'un mais de plusieurs couples d'amorces permettant ainsi l'amplification simultanée de plusieurs séquences cibles de gènes différents.

(ii) Matériel

- Thermocycleur Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus)
- Plaques 96 puits avec leurs couvercles (Applied Biosystems)

(iii) Mélange réactionnel

Les amorces sont biotinylées. Nous obtenons ainsi des fragments d'ADN amplifiés également marqués à la biotine ce qui permettra ultérieurement de faire une révélation colorimétrique.

Le mélange réactionnel diffère en fonction du Multiplex (Tableau X). La quantité d'ADN utilisée est de 500 ng par échantillon. Le pré-mixe (Roche) est prêt à l'emploi et contient la Taq polymérase, les dNTP, le MgCl₂, etc ...

Tableau X : Composition du mixe réactionnel pour un échantillon de PCR Multiplex.

Réactifs	Multiplex II	Multiplex III
ADN (100 ng/μl)	5 μl	5 μl
Pré-mixe	15 μl	20 μl
Amorces biotinylées	10 μl	20 μl
Eau (qsp 50μl)	20 μl	5 μl

(iv) Protocole

En une seule étape, 78 échantillons, un témoin positif et un témoin négatif (eau) sont amplifiés. Les réactifs sont déposés sur une plaque 96 puits. La plaque est ensuite introduite dans le thermocycleur programmé pour les différentes étapes de la PCR (Tableau XI).

Tableau XI : Conditions d'amplification pour le Multiplex II et pour le Multiplex III.

Étape	Multiplex II	Multiplex III
Dénaturation initiale	94°C – 7 min	94°C – 12 min 30 sec
Dénaturation	96°C – 15 sec	95°C – 45 sec
Hybridation } 34 cycles	60°C – 60 sec	61°C – 30 sec
	72°C – 85 sec	72°C – 30 sec
Elongation		
Elongation finale	68°C – 5 min	72°C – 7 min

(b) Détection

(i) Principe

La détection est basée sur le principe d'un dot-blot inversé : les produits de PCR marqués à la biotine sont dénaturés et fixés à des sondes allèle-spécifique immobilisées sur des bandelettes. Ces bandelettes, ou « *strips* », sont des membranes de nylon sur lesquelles ont été fixées par action d'UV les sondes complémentaires des différents polymorphismes des gènes étudiés. Pour un même locus, deux sondes sont fixés sur le strip, l'un correspondant à l'allèle sauvage, l'autre à l'allèle muté. Après fixation et lavage, on ajoute un complexe streptavidine-peroxydase (SA-HRP) qui se fixe à la biotine des fragments d'ADN hybridés. La révélation se fait ensuite par addition de peroxyde d'hydrogène (substrat A) et d'un réactif incolore (tétraméthylbenzidine ou substrat B) qui est alors oxydé en un complexe bleu (Figure 24).

(ii) Matériel

- Bain-Marie rotatif (Hot Shaker plus, Bellco)
- Membrane de nylon : strips avec sondes (Roche)
- Cuves en plastique pouvant contenir individuellement les bandelettes
- Appareil photo MP-4 (Polaroid-KODAK)

(iii) Réactifs

- SSPE : solution de sulfate de sodium EDTA
- SDS : sodium dodécyl sulfate
- Solution de dénaturation à base de NaOH
- SA-HRP : streptavidine-horseradish peroxydase
- Substrat A : H₂O₂ dans une solution de citrate
- Substrat B : 3,3', 5,5' tétraméthyl-benzidine dans du diméthyl-formamide

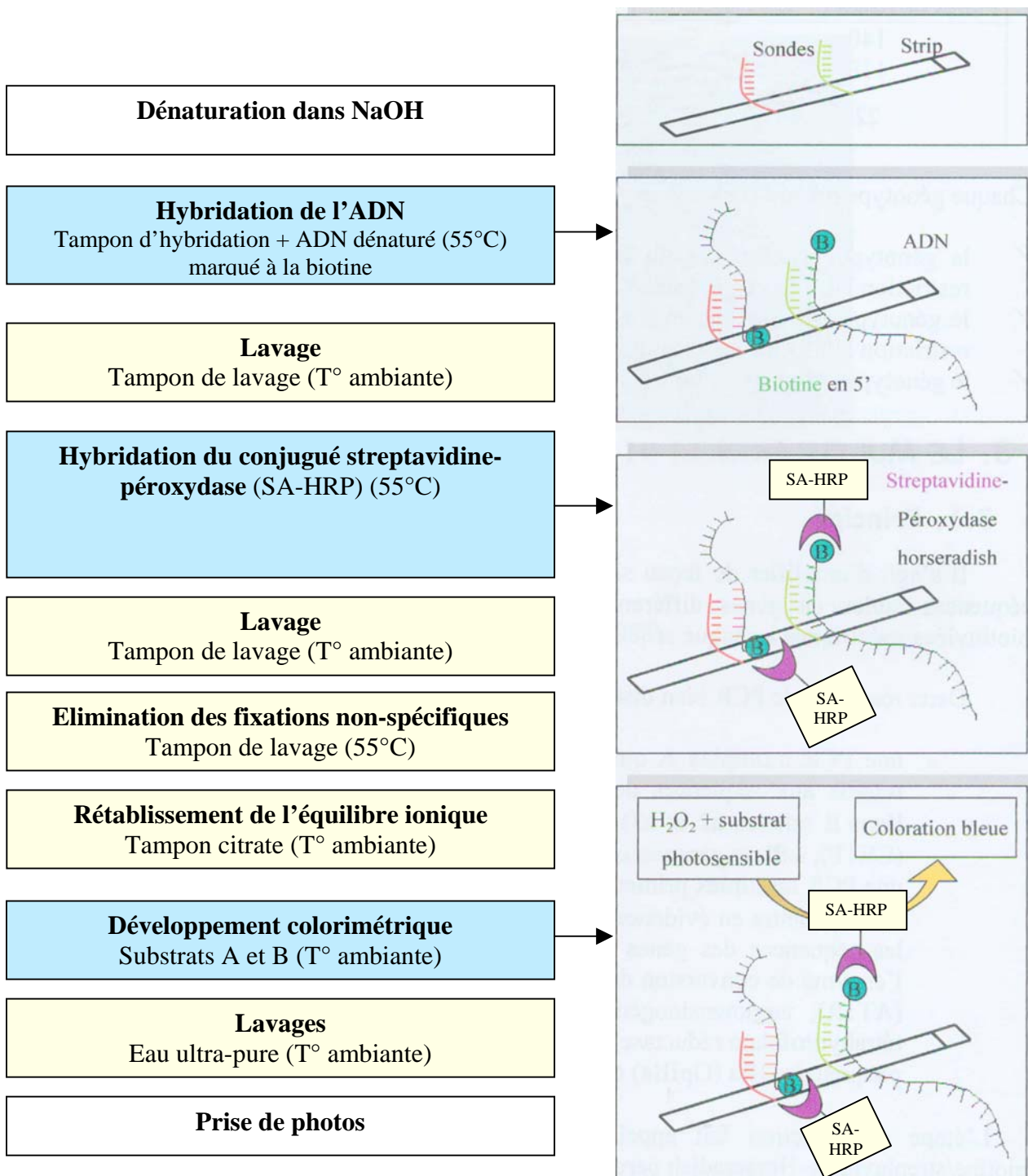


Figure 24 : Principe de la détection colorimétrique associée à la PCR Multiplex.

B : Biotine, SA-HRP : Streptavidine Horseradish Peroxydase.

(iv) Tampons

Les tampons sont préparés à différentes concentrations en fonction du Multiplex considéré :

- Tampon d'hybridation :
 - SSPE 4X pour le Multiplex II et 3X pour le III
 - SDS 0,5%
- Tampon de lavage :
 - SSPE 2X pour le Multiplex II et 1,5X pour le III
 - SDS 0,5%
- Tampon citrate 0,5X pour le Multiplex II et 1X pour le III

(v) Protocole

Les différentes étapes s'effectuent dans des cuves en plastique contenant individuellement chaque bandelette (Tableau XII). Pour chaque Multiplex, 40 bandelettes sont traitées en même temps.

(c) Lecture des résultats

Les bandelettes sont placées sur des supports adaptés puis pris en photo et lues en duplicat. Les résultats sont codés sous la forme 1 lorsque l'allèle est présent et 0 lorsqu'il est absent. La sonde complémentaire de l'allèle sauvage est située en haut. Une bande bleue en haut indique donc la présence de l'allèle sauvage. La sonde complémentaire de l'allèle muté est située en bas, et une bande bleue en bas signe la présence de l'allèle muté. Si l'individu est hétérozygote pour le polymorphisme considéré, on aura alors 2 bandes, une en haut et une en bas (Figure 25).

Tableau XII : Protocole de PCR et de détection Multiplex.

Etape	Multiplex II	Multiplex III
Dénaturation	Membrane + 3 ml tampon de lavage	
	<i>agitation 50°C, 10 min, aspirer</i>	
	Préparer : solution dénaturante (20 µl) + produit PCR (20 µl)	
Hybridation (SA-HRP)	3ml tampon hybridation + échantillons dénaturés	5ml tampon hybridation + échantillons dénaturés
	<i>agitation 50°C, 20 min, aspirer</i>	<i>agitation 55°C, 15 min, aspirer</i>
	3 ml tampon lavage	5 ml tampon lavage
	<i>agitation T° ambiante, 2 min, aspirer</i>	
	Préparer solution de conjugaison : 123ml tampon hybridation + 515µl SA-HRP	Préparer la solution de conjugaison : 205ml tampon hybridation + 1025µl SA-HRP
	3 ml solution de conjugaison	5 ml solution conjugaison
	<i>agitation 50°C, 5 min, aspirer</i>	<i>agitation 55°C, 5 min, aspirer</i>
	3 ml tampon lavage	5 ml tampon lavage
	<i>agitation T° ambiante, 2 min, aspirer</i>	
	3 ml tampon lavage	5 ml tampon lavage
	<i>agitation 50°C, 12 min, aspirer</i>	<i>agitation 55°C, 12 min, aspirer</i>
	(Conditions stringentes : permet élimination des fixations non spécifiques mais change l'équilibre ionique)	
		5ml tampon lavage
		<i>agitation T° ambiante, 2 min, aspirer</i>
	3 ml tampon citrate	5 ml de tampon citrate
	(Permet le rétablissement de l'équilibre ionique)	
<i>agitation T° ambiante, 5 min, aspirer</i>		
Développement colorimétrique	Préparation extemporanée de la solution de développement (99,4ml substrat A + 23,6ml substrat B) et laisser à l'abri de la lumière	Préparation extemporanée de la solution de développement (176,3ml substrat A + 29,9ml substrat B) et laisser à l'abri de la lumière
	3 ml solution de développement	5 ml solution de développement
	<i>agitation T° ambiante, 10 min, aspirer</i>	<i>agitation T° ambiante, 8 min, aspirer</i>
	Rinçage avec 5ml d'eau ultra-pure (répéter 2 fois)	
	<i>agitation T° ambiante, 5 min, aspirer</i>	
Lecture	Placer les membranes sur les imprimés de lecture (10 strips/imprimé) et prendre une photo	
	Laisser sécher la nuit à T° ambiante à l'abri de la lumière, puis les stocker à 4°C	

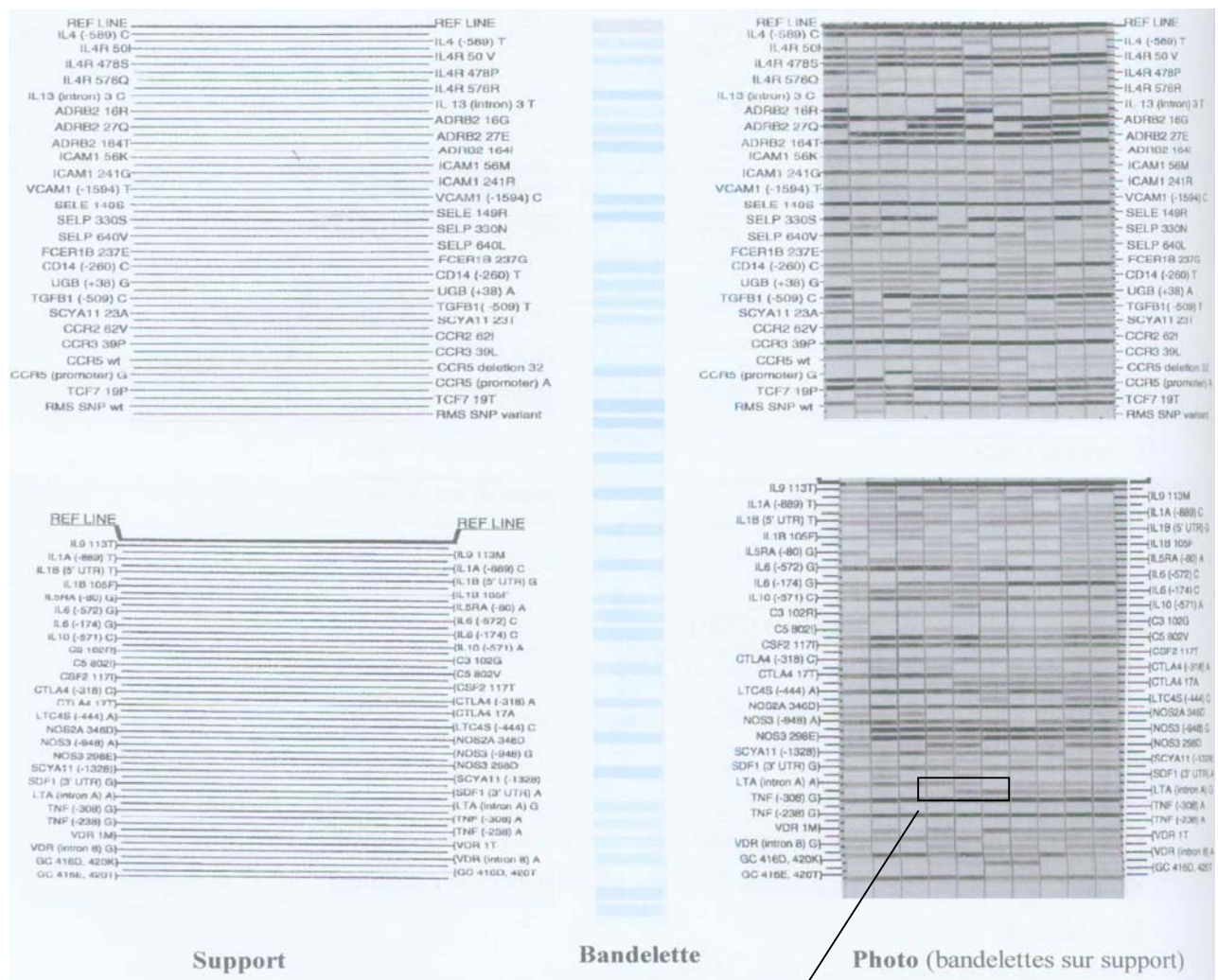


Figure 25 : Lecture des bandelettes de détection. Exemple du polymorphisme A256G du gène codant la lymphotoxine alpha (*LTA*).

2) PCR-RFLP

Afin de génotyper nos lignées pour des polymorphismes du gène codant le transporteur *ABCBI*, soit T-129C, G1199A, C1236T, G2677T/A, C3435T et T-76A, nous avons été amené à réaliser une technique de PCR-RFLP (réaction de polymérisation en chaîne – polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Cette technique est basée sur le fait que la présence de l'allèle muté crée ou entraîne la disparition d'un site de restriction pour une enzyme de restriction donnée. On amplifie par PCR un segment d'ADN spécifique de la région d'intérêt contenant la mutation ponctuelle étudiée. Le produit d'amplification est ensuite digéré par une enzyme de restriction adéquate et les produits de digestion sont séparés par électrophorèse. Les profils de digestion permettent de constater la présence ou l'absence d'une coupure enzymatique du produit amplifié, révélant la présence ou l'absence du polymorphisme. Nous nous sommes basés sur des protocoles de PCR-RFLP existants dans la littérature [61, 84, 182] ou mis en place dans l'équipe.

(a) PCR

Pour tous les polymorphismes excepté T-76A, en plus de l'échantillon d'1 μL d'ADN (100 ng/ μL), le mélange réactionnel contient 1,5 μL de tampon de l'enzyme (Sigma), 1,5 μL de dNTPs à 2mM (Roche, 100 mM), 0,15 μL d'amorces sens (Proligo) et antisens à 20 μM (Proligo, 100 μM), 10,61 μL d'eau (Molecular Grade Water, Eppendorf) et 0,09 μL de Taq polymérase (Roche, 5U/ μL). Pour T-76A, sont utilisés 2 μL d'ADN (100 ng/ μL), 2,5 μL de tampon de l'enzyme, 2,5 μL de dNTPs à 2mM (Roche, 100 mM), 2,50 μL d'amorces sens (Proligo) et antisens à 5 μM , 12,88 μL d'eau (Molecular Grade Water, Eppendorf) et 0,12 μL de Taq polymérase (Hot start Taq plus, Qiagen, 5u/ μl).

Etant donné la proximité des polymorphismes (37 paires de bases, ou pb), une seule PCR est réalisée pour les polymorphismes G1199A et C1236T. Les programmes de PCR sont présentés dans le Tableau XIII et les séquences des amorces utilisées dans le Tableau XIV.

Tableau XIII : Programmes de PCR.

Polymorphisme	Nombre de cycles	Température (°C)	Durée
T-129C, G1199A et C1236T	1	94	1 min
	35	92,5	30 sec
		53	45 sec
		72	45 sec
	1	72	2 min
	1	4	3 min
G2677T/A	1	94	1 min
	6	92,5	30 sec
		53	45 sec
		72	45 sec
	21	92,5	30 sec
		52	45 sec
		72	45 sec
	16	92,5	30 sec
		51	45 sec
		72	45 sec
	1	72	2 min
	1	4	3 min
C3435T	1	94	1 min
	35	92,5	30 sec
		63	45 sec
		72	45 sec
	1	72	2 min
1	4	3 min	
T-76A	1	95	5 min
	35	94	30 sec
		58	45 sec
		72	1 min
	1	72	7 min
1	4	infini	

Tableau XIV : Séquence des amorces.

Polymorphisme	Séquences des amorces
T-129C	Sens: 5' TCT CGA GGA ATC AGC ATT CAG TCA ATC C 3' Antisens: 5' CTA AAG GAA ACG AAG AGC GGC CTC TG 3'
G1199A et C1236T	Sens: 5' GGA ATT CAG AAA TGT TCA CTC C 3' Antisens: 5' CAT CCC CTC TGT GGG GTC ATA 3'
G2677T/A	Sens: 5' GTA CCC ATC ATT GCA ATA GCA 3' Antisens: 5' TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCG AG 3'
C3435T	Sens: 5' AGT GGC TCC GAG CAC ACC TG 3' Antisens: 5' GTT GGC CTC CTT TGC TGC CC 3'
T-76A	Sens: 5' -TTT GTC AAC ATT TTT TTG AAG C 3' Antisens: 5' -TAT TAT TGC AAA TGC TGG TTG C 3'

_ : mésappariement pour créer un site de coupure pour l'enzyme de restriction

(b) Digestion enzymatique (RFLP)

(i) Principe

Après avoir été amplifié, l'ADN est coupé par une enzyme de restriction au niveau d'un site reconnu spécifiquement. L'enzyme est choisie pour que le site de restriction soit situé au niveau de la mutation et permette ainsi de différencier l'ADN porteur de la mutation de l'ADN sauvage. Pour être un repère fiable, le site de restriction doit se trouver dans une région non répétée du génome. Une mutation modifiant la séquence primaire de l'ADN entraîne une modification de la carte de restriction (fragments supplémentaires ou absents).

(ii) Protocole

Les amplicons subissent une digestion enzymatique dans un volume final de 10 µL (15 µL pour T-76A). Le mélange réactionnel contient 5 µL (7,5µL pour T-76A) de produit de PCR, 3,85 µL d'eau (5,775 µL pour T-76A), 1 µL de tampon de l'enzyme (1,5 µL pour T-76A) et 0,15 µL (0,225 pour T-76A) d'enzyme de restriction (Fermentas sauf MspAII (Promega)). Pour le polymorphisme T-129C, il est ajouté 0,1 µL de BSA (Promega) dans le milieu réactionnel. Le polymorphisme G2677T/A étant tri-allélique, une première digestion est effectuée pour déterminer la présence ou l'absence d'un allèle muté. En cas de mutation, une deuxième digestion est effectuée pour déterminer s'il s'agit d'un T ou d'un A. Les enzymes et la longueur des fragments obtenus après digestion sont présentées dans le Tableau XV.

Tableau XV : Enzymes, sites de reconnaissance et longueur des fragments de RFLP.

Polymorphisme	Enzyme restriction	Site de restriction	fragment amplifié	fragments digérés
T-129C	MspAII	TCGAGCAG↓CGGCTCTTCCAA	197 pb	148 + 49
G1199A	BseNI	CTCCAG↓TTACCCATC	345 pb	321 + 24
C1236T	BsuRI	TGAAGGG↓CCTGAACCTGAAG GTGCAGAGTGGGCAGACGGTG GCAGACGGTGG↓CCC	345 pb	230 + 80 + 35
G2677W	Alw21I	TGCT↓CGG AAG...	108 pb	87 + 21
Si mutation pour différencier T et A	RsaI	GT↓A CCC...	108 pb	84 + 22 + 2
T-76A	XapI	...AACTAGAAGG T↓ACT CGG...	315 bp	84 + 221 ou (120 + 111)
C3435T	MboI	5'-Pu^A A T T Py-3' 3'-Py T T A A^Pu-5' (Pu = A ou G et Py = C ou T) ...GTACAGGAA GA↓GATCGTGAG	140 pb	112 + 28

X : localisation du polymorphisme

(c) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

(i) Principe

Les fragments d'ADN obtenus sont séparés selon leur longueur par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le polyacrylamide forme un maillage qui va être soumis à un courant électrique. Les fragments d'ADN vont migrer du négatif vers le positif. Plus ils sont gros, plus ils mettent longtemps à traverser le réseau de polyacrylamide. Ces fragments sont ensuite révélés sous UV par mise en présence de bromure d'éthidium, un intercalant de l'ADN qui fluoresce sous UV.

(ii) Protocole

Le gel de polyacrylamide est préparé en mélangeant de l'acryl à 40% (monomère, Sigma), du tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) (Merck), du persulfate d'ammonium (Quantum biotechnologies), et du NNN'N'-Tétra Méthyl Ethylène Diamine (TEMED, Bioprobe). L'addition de persulfate et de TEMED forme des radicaux libres qui permettent l'initiation de la polymérisation de l'acrylamide.

Le gel utilisé pour ce travail est un gel à 10% composé de : 3,15 mL d'eau, 1,125 mL d'acryl à 40%, 450 µL de TBE 10X, 45 µL de persulfate à 10% et 4,5 µL de TEMED. Une fois le gel polymérisé, 5µL d'échantillon mélangés à 1 µL de tampon de charge (Promega, 6X) (sauf pour T-76A : respectivement 15 µL et 3,5 µL) sont déposés. Un puits du gel est réservé au dépôt d'un marqueur de taille (ϕ X174 DNA/*Hinf* I Promega).

La migration se fait dans du TBE à 65V, 55 à 100 minutes selon la taille des fragments à séparer. Le gel est ensuite incubé dans un bain avec 5 µL de bromure d'éthidium (Sigma).

La figure 26 présente les profils de restriction obtenus pour les différents génotypes de chaque polymorphisme.

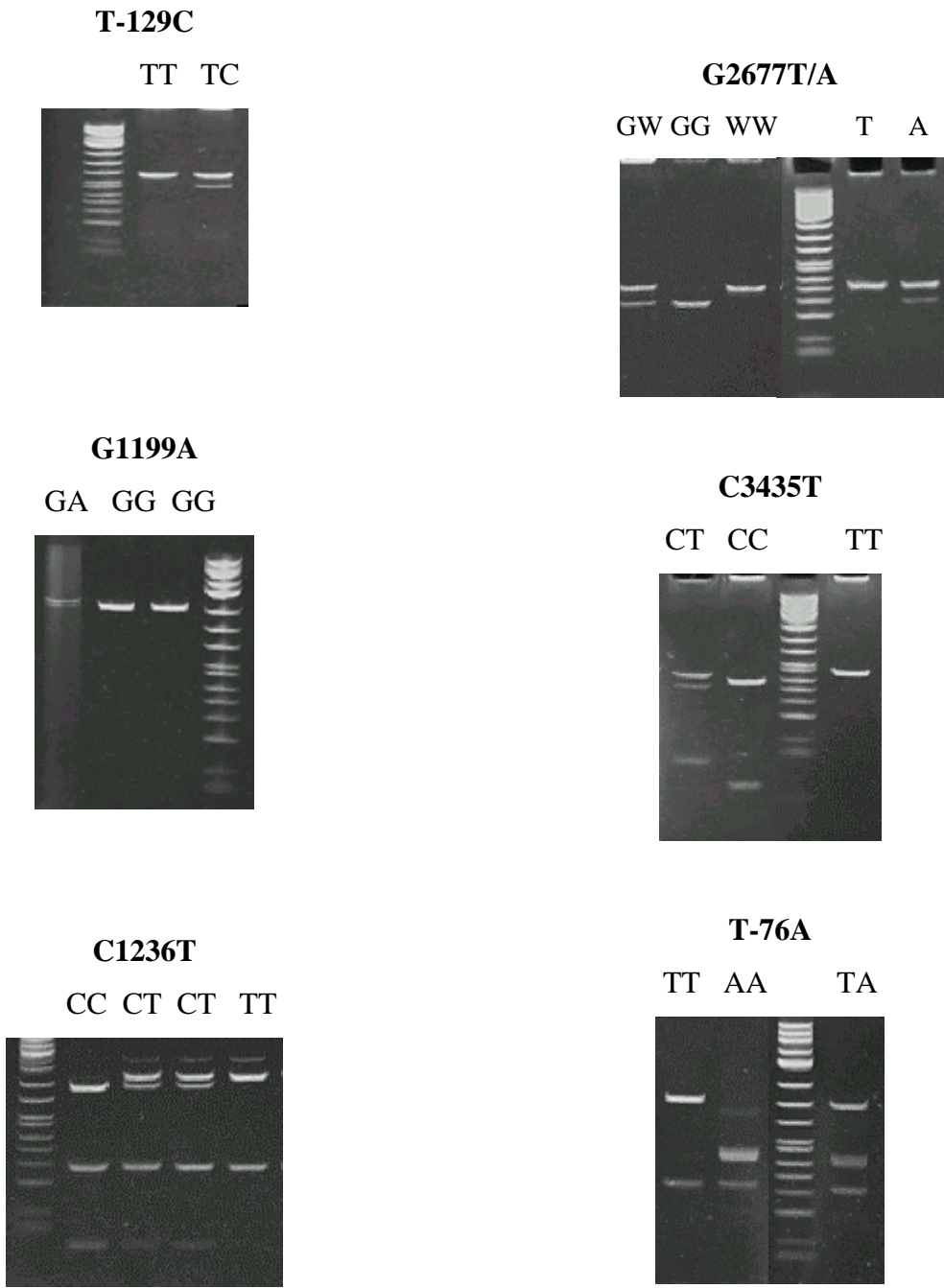


Figure 26 : Profils de restriction obtenus pour les polymorphismes étudiés par PCR-RFLP.

3) Génotypage par technique TaqMan

La dernière technique utilisée pour détecter 12 polymorphismes d'*ABCB1*, *ABCA1* et *ABCG8* est une technique quantitative de PCR en temps réel utilisant la technologie TaqMan.

(a) Principe

La PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent au cours de la réaction d'amplification. Le signal fluorescent est directement proportionnel à la quantité de produits de PCR générés. En mesurant l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la formation des produits de PCR pendant la phase exponentielle (phase au cours de laquelle la quantité de produits amplifiés est en corrélation directe avec la quantité initiale de matrice). Les produits d'amplification peuvent être détectés selon deux grands principes : par marquage non spécifique avec des agents se liant à l'ADN double brin (Sybr Green I) et par marquage spécifique du produit de PCR à l'aide d'une ou deux sonde(s) fluorescente(s) (Sondes TaqMan ou balises moléculaires) [183].

Nous avons utilisé ici deux sondes discriminantes, VIC et FAM. Dans ce cas de figure, la PCR requiert deux amorces oligonucléotidiques pour amplifier la séquence d'intérêt et deux sondes TaqMan : l'une s'hybridant à l'allèle sauvage, l'autre à l'allèle variant. Chaque sonde TaqMan renferme un fluorochrome à l'extrémité 5' spécifique de chaque type d'allèle (VIC ou FAM), un *quencher* non fluorescent (NFQ) à l'extrémité 3' et une molécule (*Minor Groove Binder*, MGB) qui s'insère dans le petit sillon de la double hélice formée par le duplex ADN cible – sonde spécifique et le stabilise (Figure 27). Cette stabilisation du complexe ADN cible-sonde va de paire avec la température de fusion du complexe (T_m). Ainsi, le T_m d'une sonde parfaitement hybridée avec le produit de PCR sera plus élevé que celui d'une sonde s'hybridant imparfaitement. Ce phénomène est accentué par l'utilisation du MGB qui va déstabiliser un duplex imparfait et donc faire chuter le T_m . Au début de l'élongation, les sondes spécifiques d'allèle s'hybrident spécifiquement à la matrice, entre les deux amorces nécessaires à l'amplification. La proximité du fluorochrome et du *quencher* empêche la détection de fluorescence. Au cours de l'étape d'élongation de la PCR, la Taq polymérase dégrade la sonde hybridée, ce qui entraîne une émission de fluorescence (Figure 28).

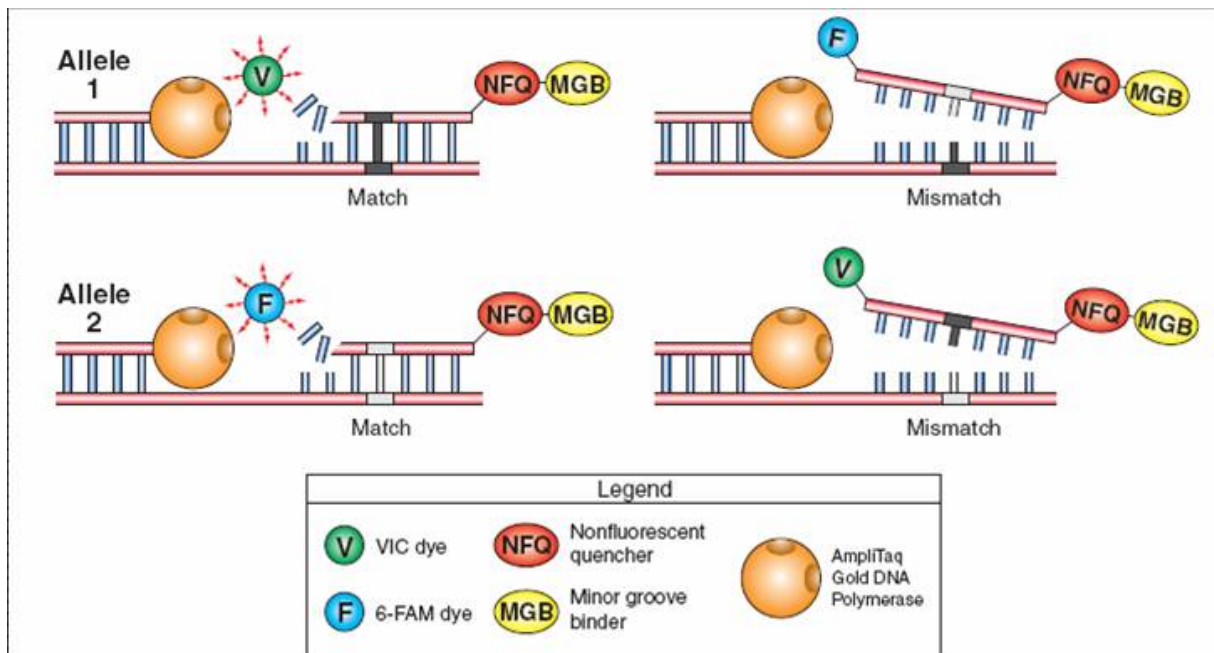


Figure 27 : Résultats des appariements et des misappariements entre les séquences cibles et sondes dans les essais utilisant la technologie TaqMan (d'après le protocole TaqMan SNP Genotyping Assays).

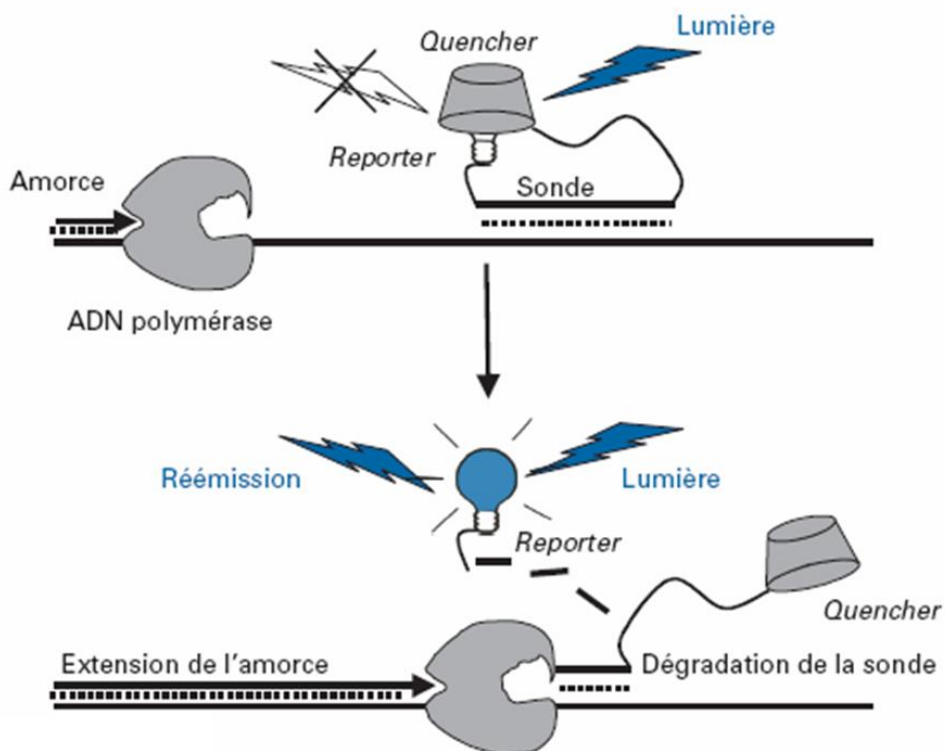


Figure 28 : Utilisation de la fluorescence dans la technologie TaqMan [183].

La discrimination allélique sera ensuite réalisée à l'aide d'un programme qui mesure la fluorescence à chaque cycle de la PCR et qui permet la discrimination entre les deux allèles présents dans les échantillons testés. Par exemple, si la sonde VIC est spécifique de l'allèle muté, une augmentation de la fluorescence VIC exclusivement indiquera une homozygotie pour l'allèle variant, une augmentation de FAM exclusivement rendra compte de la présence d'un homozygote sauvage ; et une augmentation des 2 signaux de fluorescence marquera la présence d'un individu hétérozygote présentant chacun des deux allèles recherchés.

(b) Réactifs

- TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems , 2000 reactions, 50 ml
- Eau pour chromatographie, LiChrosolv, Merck
- Mixes de sondes TaqMan, TaqMan SNP Genotyping Assays (TaqMan MGB probes, FAM™ and VIC dye-labeled), spécifiques de chaque essai (Tableau XVI).

Tableau XVI : Références des mixes de sondes TaqMan utilisés dans cette étude.

Polymorphisme	Référence du mixe de sondes
<i>ABCB1</i> - 1G>A (rs2214102)	C_15852557
<i>ABCB1</i> N21D (rs9282564)	C_2614970
<i>ABCB1</i> -76T>A (rs1922242)	C_1253821
<i>ABCA1</i> R219K (rs2230806)	C_2741051
<i>ABCA1</i> R1587K (rs2230808)	C_2741104
<i>ABCA1</i> I883M (rs4149313)	C_2741083
<i>ABCA1</i> C-7T (rs1800977)	C_9456257_10
<i>ABCA1</i> G-395C (rs2246293)	C_16235415_10
<i>ABCA1</i> C-564T (rs2422493)	C_16235101_10
<i>ABCG8</i> C54Y (rs4148211)	C_2953502
<i>ABCG8</i> T400K (rs4148217)	C_375061
<i>ABCG8</i> A632V (rs6544718)	C_25642779

(c) Protocole

Les conditions de PCR sont les mêmes quelque soit le polymorphisme étudié. Seul le mixe avec les sondes est spécifique de chaque polymorphisme. Le protocole est résumé sur la Figure 29.

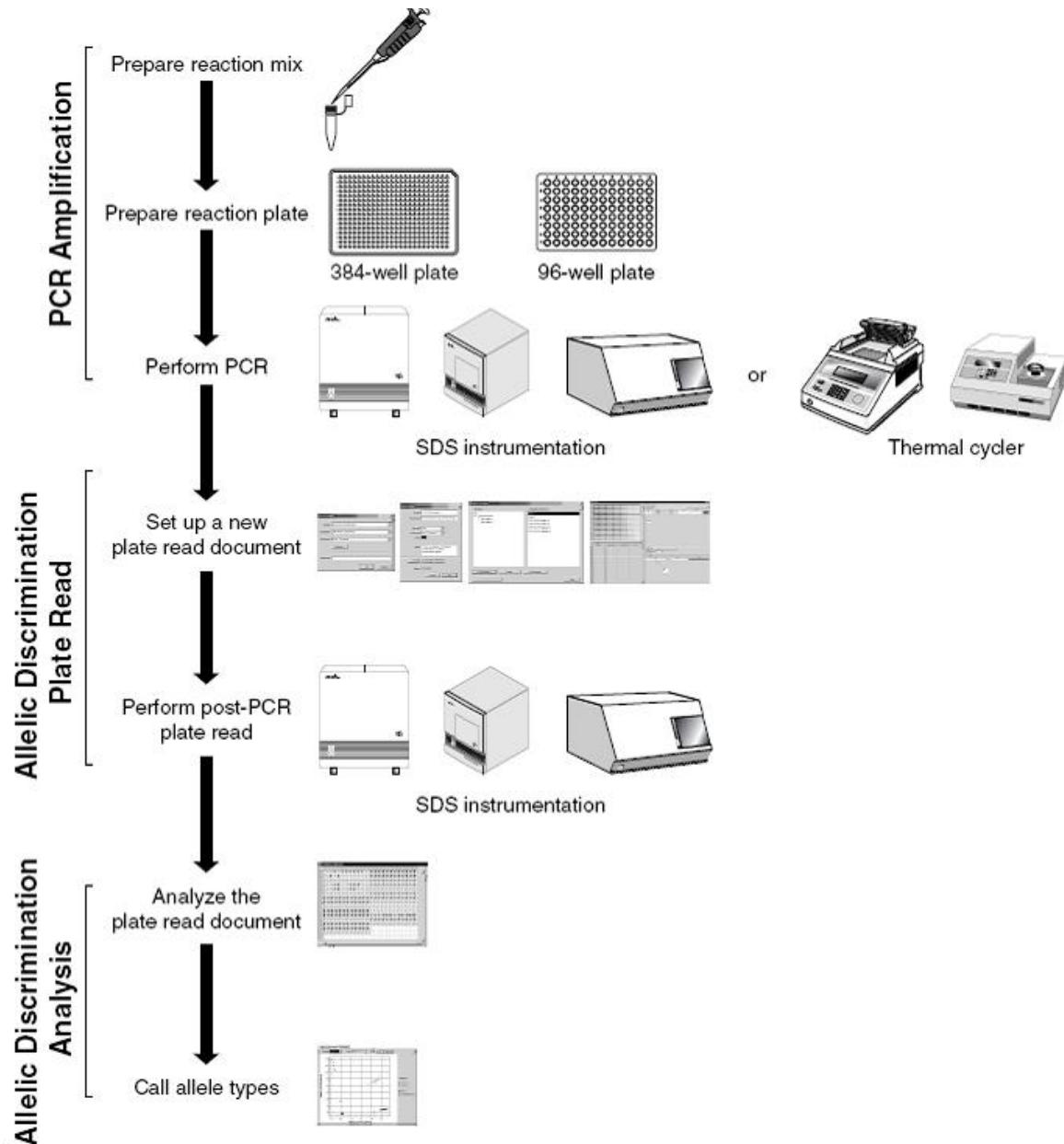


Figure 29 : Résumé de la procédure de génotypage utilisant la technologie TaqMan (d'après le protocole TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems).

(i) Préparation des échantillons et du mixe de PCR

40 μL de chaque échantillon d'ADN (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$) sont déposés dans des plaques 96 puits qui vont servir pour plusieurs PCR.

Le mixe de PCR est préparé dans un godet de 40 ml. La composition pour un échantillon est :

- Mixe de sonde (40X) : 0,125 μL
- Mixe TaqMan (2X) : 2,5 μl
- Eau : 1,375 μL

On distribue ensuite de façon automatisée chaque échantillon d'ADN (1 μL) et le mixe de PCR (4 μL) dans une plaque 384 puits à l'aide d'un robot dispatcheur (pipet robot, Biotek FX Stacker 10 Carousel, Beckman Coulter). Les plaques sont ensuite fermées par une feuille thermocollante avant d'être placées dans le thermocycleur.

(ii) Programme de PCR

Le programme de PCR est le même pour tous les polymorphismes, soit :

- 50°C, 2 min
- 95°C, 10 min
- Puis 55 fois :

{	95°C, 15 sec
}	60°C, 1 min
- 8°C, infini

La PCR est effectuée soit dans le thermocycleur 7900 HAT Abi Prism (Applied Biosystems), soit dans un thermocycleur Primus (MWG AG Biotech).

(iii) Lecture des résultats

La lecture de la fluorescence est faite dans le détecteur couplé au thermocycleur 7900 HAT Abi Prism et intégrée grâce au logiciel SDS 2.1 de l'ordinateur lié au détecteur (Applied Biosystems). Chaque échantillon est représenté par un point. On définit quel type de fluorescence est associé à chaque point (Figure 30). Par exemple, le nuage de points exprimant majoritairement de la fluorescence FAM (bleu) correspond à des homozygotes pour l'un des deux allèles, le nuage rouge correspond à une fluorescence VIC majoritaire donc à des échantillons homozygotes pour l'autre allèle, tandis que le nuage vert correspond à une émission des deux fluorescences donc à des échantillons hétérozygotes pour le polymorphisme considéré. Les points noirs correspondent à une PCR qui n'a pas marché ou à

un positionnement ambigu. Pour chaque mixe, le fournisseur précise à quel allèle, sauvage ou muté, est associé chacune des sondes VIC et FAM.

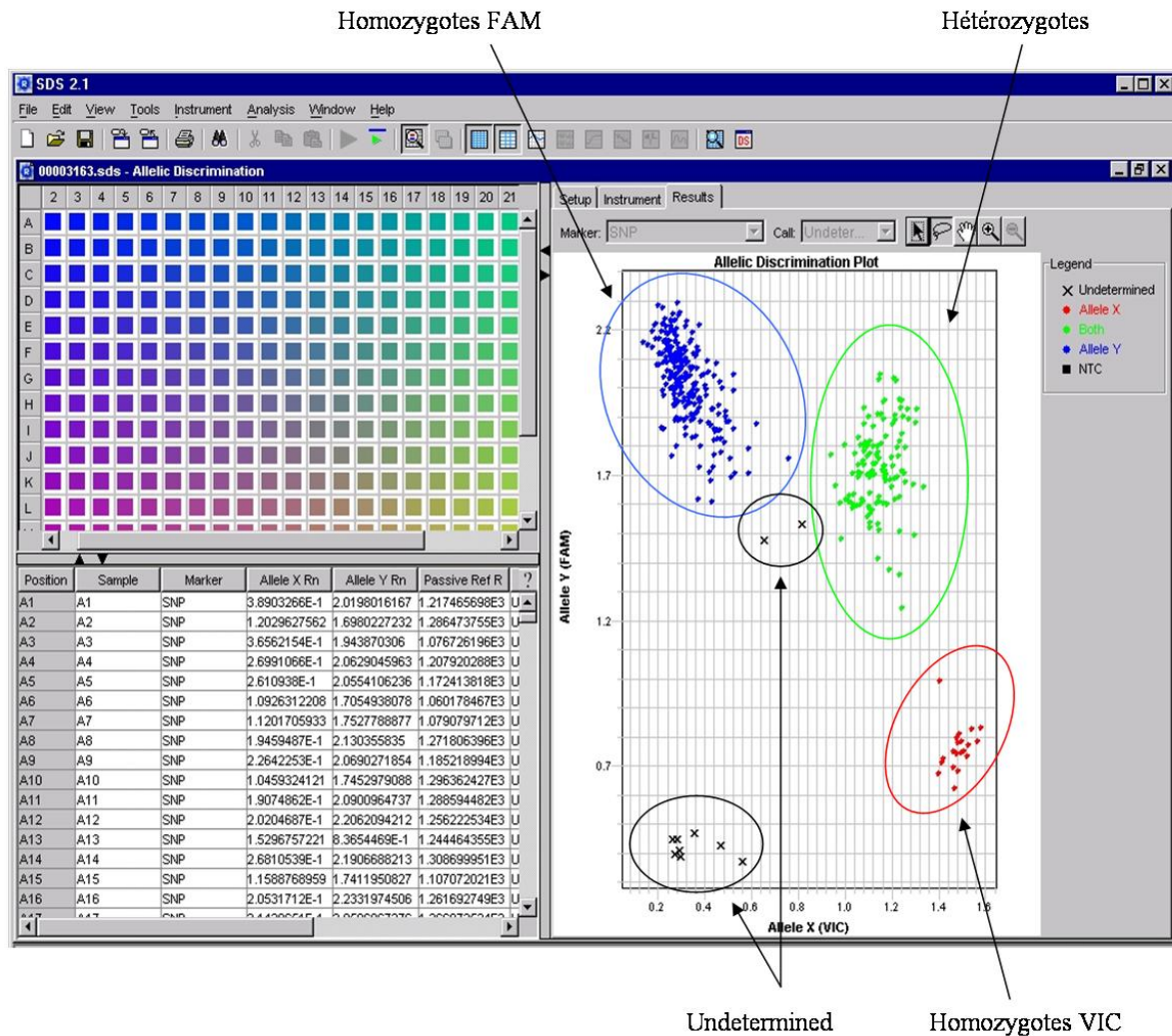


Figure 30: Détermination des génotypes en fonction du type de fluorescence.

IV. Analyses transcriptomiques

Deux types d'analyse transcriptomique ont été conduites sur les cellules mononuclées du sang périphérique de sujets de la cohorte STANISLAS : une analyse par RT-PCR en temps réel et une par puces à ADN.

A. Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique

Une banque de PBMCs a été constituée au 3^e point de recrutement de la cohorte STANISLAS selon un protocole bien défini à fort rendement en lymphocytes (97%). Brièvement, 10 ml de sang total ont été recueillis sur tube EDTA (VacutainerTM; Becton Dickinson) puis les PBMCs ont été isolés par centrifugation sur gradient de Ficoll (Ficoll-PaqueTM PLUS; Amersham Biosciences) et stockés à -80°C dans l'attente de l'extraction d'ARN [184].

B. Extraction des ARN totaux

L'ARN a été extrait des PBMCs par une procédure automatisée (MagNA Pure LC instrument) à l'aide du kit High Performance (MagNa Pure LC RNA HP isolation kit) suivant les recommandations du fournisseur (Roche Diagnostics). Ce protocole inclut un traitement à la DNase. Le choix d'une procédure automatisée permet de limiter les risques d'erreurs liés au manipulateur et d'homogénéiser les quantités extraites. L'électrophorèse sur gel d'agarose permet ensuite de visualiser l'intégrité des ARNs. L'apparition de deux bandes distinctes (correspondant aux ARN ribosomiques 18s et 28s), sans aucun « smear » est la preuve de la bonne qualité des ARNs. L'absorbance de la solution est mesurée aux longueurs d'onde 260 nm et 280 nm. Les ARNs ne sont pas ou peu contaminés par des protéines si le rapport absorbance à 260 nm / absorbance à 280 nm est compris entre 1,8 et 2. L'absorbance à 260 nm permet de connaître la quantité d'ARN présente dans les tubes :

$$[\text{ARNs}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{abs } 260 \text{ nm} \times 40 \times \text{dilution} / 1000.$$

C. Puces d'expression

La préparation des échantillons de l'extraction jusqu'au dépôt sur la lame a été effectuée au sein de notre laboratoire. La puce à ADNc a été effectuée à façon par l'industriel MGW (spotting des nucléotides) qui a également effectué la lecture des résultats.

Brièvement, 180 gènes ont été sélectionnés dont 16 enzymes du métabolisme des médicaments et 13 facteurs de transcription et un ARN non-humain (*Arabidopsis thaliana*) pour vérifier la spécificité [23, 185].

Les oligonucléotides sont issus de la base MGW et la puce d'expression a été synthétisée par la société MWG Biotech AG (Ebersberg, Allemagne). Cette puce à oligonucléotides (50 oligomères) est une lame de verre portant en duplicat les nucléotides dédiés à la mesure de l'expression des gènes sélectionnés.

Les quantités d'ARN disponibles étant faibles, il a été procédé dans une première étape à une amplification de cet ARN (kit d'amplification Amino allyl MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit (Ambion) et amorce T7-(dT)₂₄). Le brin d'ADNc double-brin ainsi obtenu est ensuite transcrit en ARN amplifié à partir de 5-(3-aminoallyl)-UTP (Ambion).

Les échantillons d'ARN amplifié (1,3 à 8 µg) ont été marqués avec le fluorochrome Cy3 et un ARN de référence (Universal Human Reference RNA, Stratagene) a été marqué par le fluorochrome Cy5. L'échantillon marqué et la quantité correspondante d'ARN de référence marqué, sont pré-hybridés sur une lame dans 5% de sérum albumine bovine puis co-hybridés à 50°C toute la nuit. Chaque lame est ensuite scannée (scanner Axon GenePix 4000B, Axon Instruments) et analysée (software GenePix version 6, Axon Instruments).

La validation des résultats obtenus grâce à cette puce a été faite par RT-PCR quantitative sur 4 gènes exprimés chez la majorité des sujets : ICAM1, TNF α , SELL et IL-6 [185].

D. Quantification par RT-PCR en temps réel

Cette technique a été appliquée afin de mesurer l'expression d'ABCB1 et de PXR dans les PBMCs de 83 sujets de la cohorte STANISLAS. Le principe consiste, après reverse transcription d'une quantité donnée d'ARN, à détecter en temps réel la fluorescence émise au fur et à mesure de la formation des amplicons dans lesquels s'insère un agent intercalant fluorescent (le SYBRGreen dans notre technique). Cette fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN complémentaire initialement présente. Nous quantifions ensuite de façon absolue grâce à une gamme de dilutions de standards à concentration connue.

1) Extraction des ARN, reverse transcription en ADN complémentaire et purification

L'ARN total extrait selon le protocole précédemment décrit est reverse-transcrit 32 minutes à 42°C dans un volume de réaction de 20 µL avec un tampon *wipe-out*, qui élimine les résidus éventuels d'ADN génomique, à l'aide du kit Quantitect RT Kit (Qiagen). Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus sont ensuite purifiés grâce à un autre kit Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit).

La concentration de la solution d'ADNc purifié (en ng/µL) est déterminée par dosage sur le spectrophotomètre Specord 205 (Analytik Jena). Sachant qu'une unité de densité optique (DO) correspond à 50 ng/µL, on multiplie la DO de la dilution par le facteur de dilution pour obtenir la concentration en ADNc. En fonction de la concentration mesurée, chaque échantillon est dilué à 5ng/µL et aliquoté en duplicat de 5 µL.

2) Principe de la quantification par PCR en temps réel

La détection du produit de PCR est faite en temps réel par mesure de l'augmentation de la fluorescence du SYBR Green se liant à l'ADN double brin. L'analyse des courbes de fusion et de quantification obtenues nous permet ensuite d'évaluer la spécificité et la quantité d'ADN amplifié.

(a) Mode d'action du SYBRGreen

Le SYBR Green est une sonde non spécifique qui s'intercale dans l'ADN double brin. Il n'émet de la fluorescence détectable qu'une fois lié à cet ADN double brin (Figure 31). Au cours de l'hybridation des amorces à l'ADNc simple brin, le SYBR Green commence à s'intercaler et le signal de fluorescence commence à s'élever (A). Au cours de la phase d'élongation, de plus en plus de SYBR Green se fixe faisant monter le signal (B). Celui-ci est maximum à la fin de l'étape d'élongation (C) puis s'effondre lors de l'étape de dénaturation du prochain cycle de PCR. A la fin de chaque phase d'élongation la fluorescence est mesurée par l'ordinateur (530 nm).

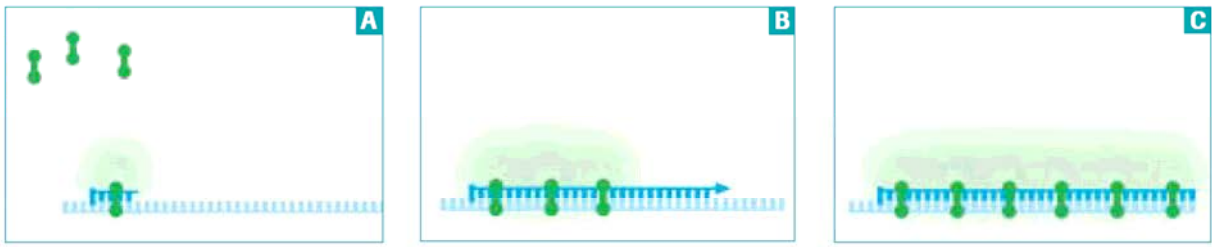


Figure 31 : Représentation schématique du mode d'action du SYBR Green.

(b) Courbe de fusion

Le produit de PCR est déposé sur gel d'agarose pour confirmer l'obtention d'un seul fragment et pour s'assurer que sa taille correspond bien à celle du fragment d'intérêt.

La phase d'amplification par PCR est suivie d'une phase d'analyse des fragments amplifiés grâce à une augmentation progressive de la température du LightCycler jusque 90°C donnant ainsi la courbe de fusion de chaque produit. Cette courbe de fusion (Figure 32) permet de confirmer l'amplification d'un seul fragment (un seul pic) qui est toujours le même d'une étape à l'autre (même température de fusion : T_m). En effet, la cassure de la pente (figure du haut) et la présence d'un seul pic (figure du bas) atteste de l'amplification d'un seul fragment. A une température spécifique du fragment amplifié, pour laquelle 50% de l'ADN synthétisé est dénaturé (T_m), la fluorescence diminue puis chute brutalement. Il est donc possible de connaître exactement la nature du fragment amplifié pour lequel la température de fusion ainsi déterminée est spécifique.

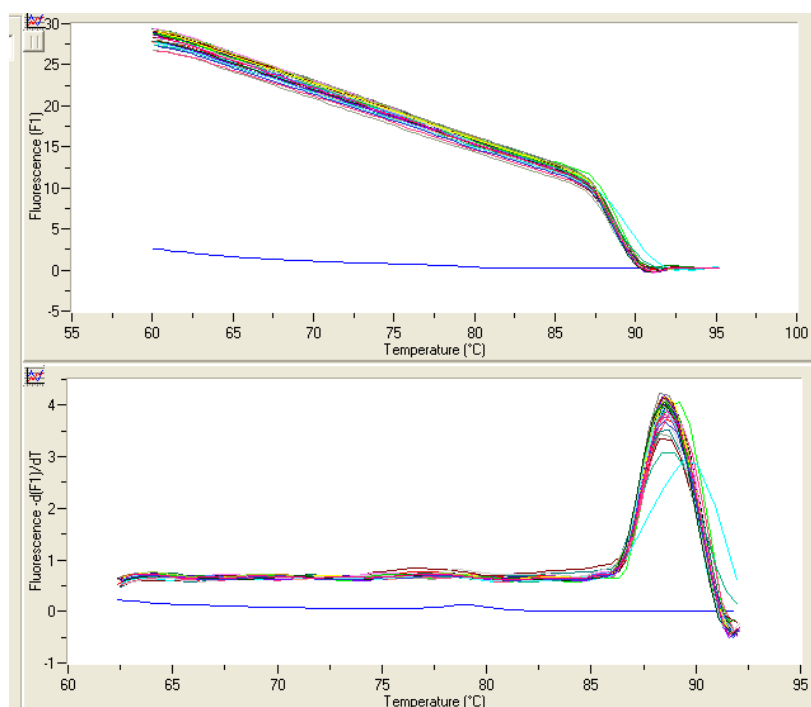


Figure 32 : Courbes de fusion.

(c) Courbe de quantification

L'estimation de la fluorescence à chaque cycle permet de suivre la formation des produits de PCR qui est représentée par des courbes de quantification (Figure 33). Le nombre de copies est fonction du nombre de cycles. Plusieurs phases sont à distinguer : une phase en deçà de laquelle aucun signal n'est détecté, une phase linéaire et une phase plateau où la PCR atteint un maximum. Chaque point d'inflexion des courbes correspond au Ct propre à chaque amplification (*Cycle Threshold* pour « cycle du seuil » de l'échantillon). Ce Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN initiale ce qui permet d'effectuer par la suite une quantification relative ou absolue grâce à une gamme d'étalonnage.

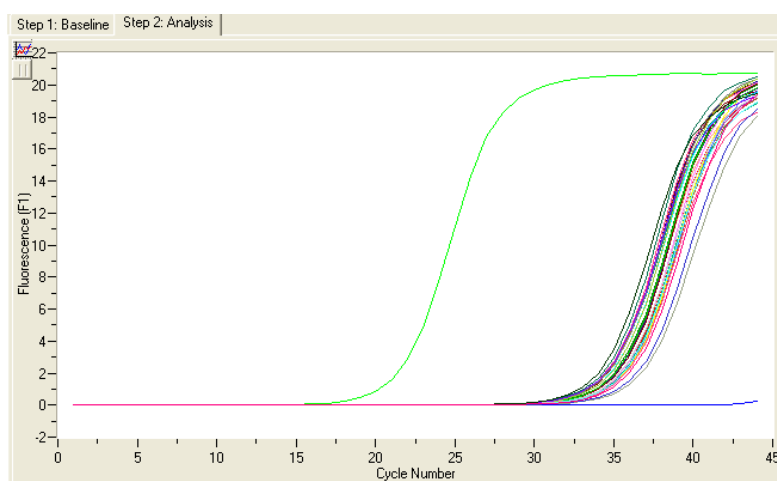


Figure 33 : Courbes de quantification.

3) Constitution des gammes de copies par PCR classique

25 ng d'ADNc sont amplifiés avec le LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I kit dans le LightCycler LC 2.0 (Roche Diagnostics). Le mélange réactionnel contient 25ng d'ADNc, le SYBRGreen, l'enzyme et son tampon, les amorces sens et antisens (concentration finale 0,5µM) et eau qsp 20 µL. Amorces et conditions de PCR sont présentées Tableau XVII.

Tableau XVII : Amorces et conditions de PCR.

<i>Gene</i>	Réf	Séquences des amorces (Sigma Proligo, 100µM)	Taille fragment	Dénaturation	Amplification	Nb cycles	Courbe de fusion
<i>ABCBI</i>	[113]	S : 5'CCCATCATTGCAATAGCAGG 3'	158 pb	95 °C, 600 sec	95 °C, 10 sec 62°C, 5 sec 72°C, 7 sec	40	95 °C, 0 sec 65 °C, 15 sec 95 °C, 0 sec
		AS : 5'TGTTCAAACCTTCTGCTCCTGA 3'					
<i>PXR</i>	[113, 186]	S : 5'CAAGCGGAAGAAAAGTGAACG 3'	246 pb	95 °C, 600 sec	95 °C, 5 sec 64 °C, 5 sec 72 °C, 12 sec	44	95 °C, 0 sec 60 °C, 15 sec 95 °C, 0 sec
		AS : 5'CACAGATCTTTCCGGACCTG 3'					

S sens ; AS Antisens

L'ADN amplifié est ensuite purifié sur colonnes Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit) puis dosé. Le nombre de copies équivalent est calculé de la façon suivante :

$$\text{Nombre de copies}/\mu\text{L} = \frac{6.10^{23} \text{ (copies/mol)} \times \text{concentration [g}/\mu\text{L]}}{\text{Masse moléculaire [g/mol]}}$$

avec :

Masse moléculaire (g/mol)=nombre de paire de bases x 660 Daltons (masse moyenne d'une base)

1 mol = 6.10^{23} molécules (copies)

Lorsque l'on connaît le nombre de copies dans la solution mère, on procède ensuite à des dilutions en cascade pour constituer une gamme de copies ou courbe de calibration. Cette gamme est ensuite insérée dans chaque série de PCR pour quantifier le nombre de copies dans chaque échantillon.

4) Quantification des échantillons

L'étape ultime consiste à amplifier simultanément une quantité inconnue d'ADNc du gène d'intérêt avec les différents points de la gamme pour lesquels le nombre de transcrits est connu.

Chaque échantillon est traité en duplicat. Une quantité constante d'ADNc (25 ng) est amplifiée par PCR avec le LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I kit dans le thermocycleur LightCycler LC 2.0 (Roche Diagnostics) selon le même principe que pour l'établissement de la gamme. La gamme de copies est testée en parallèle. La gamme réalisée est comprise généralement entre 10 et 10^8 copies. Chaque dilution au $10^{\text{ème}}$ de cette gamme correspond à une différence de 3,3 cycles.

L'appareil calcule ensuite le nombre de copies correspondant au fragment du gène d'intérêt à partir de la régression linéaire de la droite standard.

Le calcul de la pente de la courbe étalon permet de s'assurer de la qualité de notre gamme et de l'efficacité de notre PCR. En plus, d'un témoin négatif (eau) et d'un témoin positif (un point de gamme), des contrôles sont également passés dans chaque série de PCR afin de déterminer les coefficients de variation analytique.

V. Culture cellulaire et lignées

Nous avons étudié les 7 lignées cellulaires continues Thp1, U937, HL60, K562, KYN2, HepG2 et Caco2. La lignée HepG2 nous a été donnée par le Pr Dauca, Caco2 par le Dr Sabolovic (Nancy, France), Thp1 et U937 par le Dr Garnotel et K562 par le Pr Jeannesson (Reims, France). Ces cellules ont été obtenues via l'ATCC (American Type Culture Collection) ou via l'ECACC (European Collection of Cell Cultures), sauf la lignée Kyn2 qui nous a été donnée par le Dr Kojiro (Japon).

Après décongélation d'un culot cellulaire, chaque lignée est mise en culture une à deux semaines pour obtenir une quantité suffisante de cellules avant repiquage. Les cellules sont cultivées en flasques dans un milieu spécifique et placées dans une étuve dans une atmosphère à 37°C enrichie de 5% de CO₂. La densité cellulaire et la fréquence des repiquages sont propres à chaque type cellulaire.

A. Préparation des milieux de culture

Les milieux de culture spécifiques à chaque lignée sont préparés sous hotte à flux laminaire à partir d'un milieu nutritif RPMI, MEM ou DMEM (Invitrogen) correctement supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF ; Bio West) et en différents additifs dont des antibiotiques et des antifongiques (Sigma).

B. Décongélation d'une lignée cellulaire

Les cellules sont conservées dans l'azote liquide en cryotube dans 90 % de milieu complet (ou de SVF) et 10% de DMSO (Invitrogen). La décongélation se fait le plus rapide possible pour éviter la souffrance cellulaire.

C. Numération cellulaire

La numération se fait en utilisant des plaques de verres calibrées appelées hématimètres : les cellules de Malassez, Thoma ou Neubauer. La lame utilisée ici est une lame de Malassez. Les prélèvements riches en cellules sont comptés après dilution adéquate.

D.Repiquage

Les cellules sont cultivées dans 20 ml de milieu complet dans des flasques de 75 cm² (VWR). La densité cellulaire optimale pour la croissance des cellules et la fréquence des passages sont propres à chaque type cellulaire. En moyenne, les cellules en suspension sont repiquées tous les deux à trois jours et les cellules adhérentes une à deux fois par semaine.

Les cellules en suspension sont repiquées par dilution directe. Le nombre de flasques nécessaires est évalué par la croissance des cellules observée au microscope. Pour une dilution 1 : x, préparer x flasques.

- Sortir la/les flasque(s) de l'étuve, observer les cellules à l'œil nu et au microscope,
- Mettre dans chaque flasque environ 18 mL de milieu complet,
- Compléter chaque flasque par : volume total de suspension cellulaire/x,
- Homogénéiser et placer les flasques à l'étuve, 5% de CO₂, 37 °C.

Pour les cellules adhérentes :

- Sortir la/les flasque(s) de l'étuve, et observer les cellules à l'œil nu et au microscope,
- Eliminer le surnageant et laver les cellules avec 5 à 10 ml de PBS (Eurobio) porté préalablement à 37°C,
- Vider le PBS et ajouter 5 ml de trypsine-EDTA à 25 µg/ml (Sigma),
- Laisser agir quelques secondes en agitant horizontalement la flasque,
- Vider la trypsine,
- Laisser agir 2 à 3 minutes sous la hotte, les cellules se décollent suite à l'action de la protéase,
- Reprendre en suspension dans 5 ml de milieu,
- Procéder au comptage puis au passage comme pour des cellules en suspension,
- Homogénéiser et placer les flasques à l'étuve.

VI. Etudes statistiques

A. Etudes d'associations génotypes-phénotypes

1) Equilibre de Hardy-Weinberg

La loi de Hardy-Weinberg permet le calcul de fréquences génotypiques théoriques à partir de fréquences alléliques. L'équilibre de Hardy-Weinberg est le modèle théorique central de la génétique des populations. Cette notion est soumise aux conditions suivantes :

- la population est très grande et panmictique (les couples se forment au hasard et leurs gamètes se rencontrent au hasard),
- il ne doit y avoir ni sélection, ni mutation, ni migration,
- les générations successives sont discrètes (pas de croisement entre générations différentes).

Dans ces conditions, la diversité génétique de la population se maintient et doit tendre vers un équilibre stable de la distribution génotypique.

Soient A et a deux allèles d'un même locus avec fréquence allélique $f(A)=p$ et $f(a)=q=(1-p)$.

Les fréquences génotypiques en équilibre de Hardy-Weinberg sont :

$$f(AA)=p^2 \quad f(Aa)=2pq \quad f(aa)=q^2$$

L'absence de déviation entre les fréquences génotypiques observées dans notre étude et l'équilibre prédit par la loi de Hardy-Weinberg a été vérifiée par un test de χ^2 (ddl=1).

2) Estimation des déséquilibres de liaison et haplotypes

Le déséquilibre de liaison est un concept qui permet de prédire l'évolution simultanée de 2 loci situés sur le même chromosome. Plus le déséquilibre de liaison est important, plus la probabilité que les deux allèles soient transmis ensemble est élevée, ce qui est particulièrement le cas pour 2 polymorphismes physiquement proches sur le chromosome.

Dans le cas de deux loci bialléliques, A et a sont les allèles du premier locus et B et b du second. Les fréquences alléliques sont p, 1-p, q, 1-q et la fréquence des gamètes porteurs des allèles A et B étant P_{AB} , le déséquilibre de liaison D est défini par la relation :

$$D = P_{AB} - (p*q)$$

Si $D=0$, il y a absence de déséquilibre de liaison

Si $D \neq 0$, il y a déséquilibre de liaison

On utilise généralement $D' = D/D_{\max}$

avec $D_{\max} = \min(P_{AB}, P_{ab})$ si $D < 0$ ou $D_{\max} = \min(P_{Ab}, P_{aB})$ si $D > 0$

Si $D' > 0$, la combinaison des 2 allèles les plus rares est favorisée

Si $D' < 0$, l'allèle rare d'un polymorphisme est préférentiellement associé à l'allèle fréquent de l'autre.

Les haplotypes représentent les combinaisons de plusieurs allèles au sein d'un gène ou d'une région chromosomique. Dans ce travail, les déséquilibres de liaison et les fréquences haplotypiques ont été estimés par le logiciel THESIAS. Ce logiciel a également été utilisé pour estimer les effets des haplotypes sur les lipides par comparaison avec un haplotype de référence qui est l'haplotype le plus fréquent.

Ce logiciel THESIAS a été développé par D. Tregouet, de l'INSERM U525 [187]. Il s'agit d'une méthode permettant l'analyse haplotypique de traits complexes. Elle est basée sur l'algorithme de maximisation de la vraisemblance SEM (*Stochastic Expectation Maximisation*) et permet de tester de manière flexible les effets d'haplotypes sur un phénotype tout en tenant compte de variables d'environnement.

3) Etudes d'associations entre polymorphismes et variables biologiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS software version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

La normalité de la distribution des phénotypes a été testée avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Pour les paramètres dont la distribution n'est pas normale, les valeurs ont été log transformées pour normaliser les distributions.

L'analyse descriptive utilise pour les données continues la moyenne arithmétique plus ou moins l'écart-type ($m \pm SD$) en cas de distribution normale et la moyenne géométrique et l'intervalle de 1 SD (m (intervalle de 1 SD)) si la distribution est non normale.

Les tests t de Student ou de Mann-Whitney ont été utilisés pour comparer les moyennes des variables quantitatives (âge, IMC, cholestérol total, LDL, HDL, triglycérides, ApoA1, ApoB, ApoC3 et ApoE) entre groupes. Le test de χ^2 a été utilisé pour les variables catégorielles (tabac : non fumeurs, fumeurs actuels et ex-fumeurs ; et génotypes).

Pour les études d'associations génétiques, afin de tenir compte de la non indépendance des individus dans la cellule familiale, l'analyse de régression multiple a été conduite dans la population totale en utilisant la technique GEE (Equations d'estimation généralisées - Proc GENMOD, SAS). Les hommes et les femmes ont été analysés également séparément pour déterminer l'effet quantitatif de chaque polymorphisme. Les enfants ont été gardés pour les analyses après ajustement sur l'effet famille et sur l'effet génération. Les variables sexe, âge, génération, tabac, IMC ; contraceptifs oraux et thérapie hormonale substitutive chez les femmes ; ont été incluses dans le modèle.

Si le nombre de sujets homozygotes pour un allèle est trop faible ($n < 5$) les homozygotes pour l'allèle le moins fréquent et les hétérozygotes sont poolés.

Pour tous les modèles (alléliques (all), dominant (dom) ou codominant (cod)) et après correction, nous avons considéré comme seuil de significativité $p < 0,05$ sauf pour les études d'associations entre polymorphismes d'*ABCB1* et variables lipidiques dans la cohorte STANISLAS ($< 0,02$) et dans la population HYDROGENE ($p < 0,04$).

B. Etudes familiales

Ces études ont été limitées à des analyses de corrélations familiales. Afin d'estimer les ressemblances familiales, c'est-à-dire le degré de ressemblance pour un trait particulier dans une famille, les corrélations intrafamiliales ont été calculées par des techniques de maximum de vraisemblance en utilisant le logiciel COFRAM. Ce programme statistique permet d'ajuster dans chaque modèle sur les covariables simultanément et séparément pour les pères, les mères, les fils et les filles. La signification des corrélations familiales ou des différences entre sexe ou génération a été testée par le test de maximum de vraisemblance (*log-likelihood ratio*).

Plusieurs modèles ont été comparés :

- un modèle général où il existe un effet du sexe des parents et des enfants sur les corrélations. On estime alors les 8 corrélations,
- un modèle où il n'y a pas d'effet du sexe c'est-à-dire que corrélations mère-fille = père-fille = mère-fils = père-fils. On estime alors 3 corrélations seulement : père-mère ; parent-enfant et enfant-enfant,
- un modèle où l'on test en plus l'effet du polymorphisme d'intérêt.

C. Puces d'expression

La normalisation et l'analyse des données ont été faites grâce au logiciel Genespring v6.1 software (Silicon Genetics, Agilent). Le ratio intensité Cy3/bruit de fond Cy3 a été calculé pour chaque spot. L'expression ou la non-expression a été évaluée par un test de t de Student ($p < 0,01$). Si pour un ARN donné la moyenne des ratios (2 spots par lame) n'est pas significativement différente de la moyenne des ratios pour l'ARN d'*Arabidopsis thaliana* (8 spots par lame), le gène est considéré comme non-déTECTable. Enfin, les coefficients de corrélation de Spearman ont été calculés pour évaluer les relations entre l'expression des différents gènes.

D. Etudes d'expression par RT-PCR quantitative en temps réel

Cette étude a été réalisée sur un sous échantillon d'individus ayant participé au troisième bilan de la cohorte STANISLAS. Pour l'étude de transcriptomique, le calcul des coefficients de corrélation de Pearson et la technique de régression multiple ont été utilisés pour évaluer les inter-relations entre l'expression de l'ARNm d'ABCBI ou de PXR et les variables potentiellement associées, physiologiques, biologiques ou génétiques. Dans un premier temps, les déterminants de l'expression de l'ARNm d'ABCBI ou de PXR ont été recherchés, les variables explicatives testées étaient : âge, sexe, IMC, tabac, taux de globules blancs et leurs différents types cellulaires, enzymes hépatiques dont GGT, PAL, TGO et TGP, pressions artérielles systolique et diastolique et les 8 polymorphismes d'ABCBI précédemment étudiés. Dans un deuxième temps, les déterminants des concentrations de cholestérol, HDL, LDL, triglycérides, ApoA1 et ApoB ont été recherchés. Compte tenu du faible effectif et des distributions non gaussiennes de certains paramètres, le test de Kruskal-Wallis a été également utilisé.

RESULTATS & DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans une première partie, nous nous sommes consacrés à l'analyse génétique du transporteur ABCB1. Nous avons étudié la répartition des polymorphismes T-129C, G-1A, G1199A, A61G, C1236T, G2677T/A, T-76A et C3435T d'*ABCB1* dans un échantillon supposé sain de la cohorte Stanislas et nous avons réalisé des études d'association entre les différents génotypes observés et les taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques. De plus, nous avons réalisé le même type d'associations entre taux de lipides et polymorphismes d'*ABCA1* et d'*ABCG8*, afin d'estimer la part du transporteur ABCB1 dans la variabilité génétique des lipides en comparaison à celle d'autres transporteurs ABC dont l'influence des polymorphismes sur les lipides est connue. Enfin, nous avons étudié l'effet des génotypes les plus fréquents d'*ABCB1* sur l'homéostasie des lipides dans une population d'hypertendus-diabétiques, donc à risque cardiovasculaire élevé.

Dans une seconde partie, nous avons effectué dans les PBMCs une analyse transcriptomique d'enzymes du métabolisme des médicaments, de transporteurs et des facteurs de transcription associés. Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à étudier grâce à une puce l'expression d'un grand nombre d'enzymes du métabolisme des médicaments et de facteurs de transcription, dont PXR, afin d'évaluer si les PBMCs seraient un tissu d'intérêt pour étudier l'expression de ces gènes en physiopathologie cardiovasculaire. Nous avons ensuite étudié l'expression quantitative de l'ARN messenger (ARNm) du transporteur ABCB1 et d'un facteur de transcription impliqué dans sa régulation, PXR, dans les cellules mononuclées du sang périphérique de sujets sains de la cohorte Stanislas. Nous avons étudié les facteurs de variabilité interindividuelle, dont les polymorphismes, de l'expression d'ABCB1 et de PXR. Nous avons ensuite corrélé l'expression d'ABCB1 et de PXR. Finalement, nous nous sommes intéressés aux associations entre ARNm d'ABCB1 et taux de lipides plasmatiques afin de montrer si l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs serait un marqueur intéressant du risque cardiovasculaire.

I. Analyse génomique du transporteur ABCB1 et lipides chez des sujets sains de la cohorte STANISLAS

A. Caractéristiques de l'échantillon étudié

L'échantillon de la cohorte STANISLAS étudié est composé de 227 individus adultes et de 144 enfants. La moyenne d'âge de la population est de 36,4 ans et de 45,1 ans si nous ne considérons que les parents. Parmi les enfants, 48 garçons et 37 filles ont moins de 18 ans. Les différentes caractéristiques démographiques et cliniques de cet échantillon en fonction du sexe et du statut parent/enfant sont résumées dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII : Caractéristiques de l'échantillon STANISLAS étudié.

Caractéristiques	Pères (n=104)	Mères (n=123)	p	Fils (n=79)	Filles (n=65)	p	Total (n=371)
Age (années)	45,5 ± 4,3	43,7 ± 4,4	0,004	17,1 ± 3,4	17,2 ± 3,1	0,77	33,9 ± 13,9
IMC (kg/m ²)	25,9 ± 3,2	24,1 ± 3,8	0,0003	20,8 ± 2,7	21,3 ± 2,8	0,35	23,4 ± 3,8
Fumeurs actifs (%)	26,9	15,5	0,03	25,6	20,6	0,455	21,7
CO (%)	-	17,1		-	21,5		
THS (%)	-	18,7		-	-		
Cholestérol total (mmol/L)	5,90 ± 1,04	5,68 ± 0,97	0,10	4,31 ± 0,72	4,81 ± 0,94	0,0005	5,30 ± 1,13
Triglycérides (mmol/L) ^a	1,41 ± 0,74	1,04 ± 0,45	<0,0001	0,87 ± 0,43	0,94 ± 0,54	0,48	1,09 ± 0,59
LDL (mmol/L) ^a	3,79 ± 0,95	3,42 ± 0,94	0,002	2,42 ± 0,68	2,78 ± 0,72	0,002	3,20 ± 0,92
HDL (mmol/L) ^a	1,47 ± 0,38	1,78 ± 0,40	<0,0001	1,49 ± 0,37	1,61 ± 0,34	0,025	1,72 ± 0,39
ApoB (mmol/L) ^a	1,08 ± 0,25	0,98 ± 0,22	0,0006	0,70 ± 0,16	0,82 ± 0,21	0,0002	0,92 ± 0,26
ApoA1 (mmol/L)	1,56 ± 0,19	1,70 ± 0,24	<0,0001	1,45 ± 0,18	1,54 ± 0,28	0,02	1,58 ± 0,24
apoC3 (mmol/L) ^{ab}	102,3 ± 33,0	88,8 ± 27,3	0,003	70,0 ± 20,0	78,8 ± 28,9	0,15	86,9 ± 30,3
ApoE (mmol/L) ^a	42,2 ± 13,9	40,0 ± 11,4	0,17	34,5 ± 11,0	40,8 ± 12,0	0,0006	39,6 ± 12,4

IMC Indice de masse corporelle; CO Contraceptifs oraux; THS Traitement hormonal substitutif

^a Distribution non normale

^b ApoC3 : existence de valeurs manquantes (n=80, 90, 60 and 49 respectivement)

B. Analyse des variants du gène *ABCB1* (ARTICLE N°1)

D'après la littérature, les polymorphismes d'*ABCB1* sont associés à des modulations de la pharmacocinétique de médicaments, à des modifications de la réponse à certains traitements, ou à la susceptibilité à des pathologies [31]. De plus, la fréquence des variants et des haplotypes d'*ABCB1* peut varier en fonction de l'ethnie considérée [77]. Dans la première étape de notre travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés à déterminer la fréquence dans notre échantillon de 8 polymorphismes d'*ABCB1*, dont nous avons souligné l'intérêt dans l'introduction, et des haplotypes formés par ces polymorphismes.

1) Fréquence des polymorphismes d'*ABCB1*

Nous avons établi la fréquence des polymorphismes T-129C, G-1A, A61G, G1199A, C1236T, T-76A, G2677W et C3435T d'*ABCB1* dans notre échantillon de la cohorte STANISLAS. Comme cette population est composée de familles, nous avons également déterminé la fréquence de ces polymorphismes dans le sous-groupe des parents afin 1) de vérifier l'adéquation avec l'équilibre prédit par Hardy-Weinberg 2) de comparer ces fréquences avec celles publiées dans la littérature et 3) de tester les déséquilibres de liaison.

En raison d'un trop petit nombre de sujets porteurs de l'allèle muté A pour le polymorphisme G2677T/A (12 GA, 7 TA et 1 AA), les sujets porteurs des allèles mutés T et A ont été regroupés en un allèle « W ».

La distribution des génotypes chez les parents respecte l'équilibre prédit par la loi de Hardy-Weinberg (résultats non présentés). De plus, chez les parents exclusivement, la fréquence de l'allèle muté pour les polymorphismes T-129C, G-1A, A61G, G1199A, C1236T, T-76A, G2677W et C3435T est respectivement de 0,04 ; 0,08 ; 0,09 ; 0,06 ; 0,42 ; 0,46 ; 0,45 et 0,46 [188].

Les fréquences des allèles mutés dans l'ensemble de la population de travail sont de 0,04, 0,08 ; 0,09 ; 0,06 ; 0,41 ; 0,46 ; 0,44 et 0,46 pour les polymorphismes T-129C, G-1A, A61G, G1199A, C1236T, T-76A, G2677W et C3435T (Tableau XIX). Ces fréquences ne diffèrent pas significativement de celles observées chez les parents.

Tableau XIX : Fréquences alléliques et génotypiques de 8 polymorphismes d'*ABCBI* dans l'échantillon étudié (n=371).

Polymorphisme	Fréquences génotypiques (effectif)			Fréquences alléliques	
T-129C	TT 0,92 (338)	TC 0,08 (31)	CC 0,00 (0)	T 0,96	C 0,04
G-1A	GG 0,85 (312)	GA 0,14 (53)	AA 0,01 (4)	G 0,92	A 0,08
A61G	AA 0,84 (308)	AG 0,15 (56)	GG 0,01 (4)	A 0,91	G 0,09
G1199A	GG 0,885 (322)	GA 0,11 (40)	AA 0,005 (2)	G 0,94	A 0,06
C1236T	CC 0,34 (124)	CT 0,50 (183)	TT 0,16 (60)	C 0,59	T 0,41
T-76A	TT 0,28 (104)	TA 0,51 (190)	AA 0,20 (75)	T 0,54	A 0,46
G2677W ^a	GG 0,30 (111)	GW 0,51 (190)	WW 0,19 (69)	G 0,56	W 0,44
C3435T	CC 0,28 (102)	CT 0,51 (185)	TT 0,20 (73)	C 0,54	T 0,46

^a W = T ou A

2) Déséquilibres de liaison et fréquence des haplotypes

Le déséquilibre de liaison (DL ou D') est un concept qui permet de prédire l'évolution simultanée de 2 loci situés sur le même chromosome. Plus le déséquilibre de liaison est important, plus la probabilité que les deux allèles soient transmis ensemble est élevée, ce qui est particulièrement le cas pour 2 polymorphismes physiquement proches sur le chromosome. D'après la littérature, de nombreux polymorphismes d'*ABCBI* sont en déséquilibre de liaison [31, 77]. C'est-à-dire que dans le cadre d'un DL positif élevé, la probabilité que 2 allèles mutés soient transmis simultanément est élevée. L'existence de DL rend difficile l'attribution d'un effet à un polymorphisme donné. Dans la littérature, l'impact des polymorphismes d'*ABCBI* est ainsi un sujet très débattu [31]. Par exemple, C3435T, associé à une modification de l'expression d'*ABCBI* est un polymorphisme silencieux. Une étude récente rapporte que ce polymorphisme réduirait la stabilité de l'ARNm [86]. Cependant, il n'est pas exclu que l'effet apparent de ce polymorphisme soit dû à un autre polymorphisme avec lequel il est en DL comme G2677T/A [82].

La meilleure approche haplotypique consisterait à effectuer un séquençage, à définir l'haplotype le plus large possible puis à le restreindre au nombre minimal de SNPs qui doivent être génotypés pour avoir le meilleur effet prédictif pour l'haplotype. De plus, dans les faibles échantillons, les SNPs de fréquences inférieures à 5% ne devraient pas être

considérés [106]. Ce travail est difficile et les études sont généralement conduites sur une sélection de quelques polymorphismes.

Nous avons donc étudié les DL entre les 8 polymorphismes d'*ABCB1* retenus et les haplotypes associés au sous-groupe d'adultes de notre population. Nous montrons que les 8 polymorphismes étudiés sont en déséquilibre de liaison à des degrés variables (Figure 34). Les valeurs de DL entre les polymorphismes aux positions -129, -1, 61 et 1199 ne sont pas significatives suite aux faibles effectifs de sujets mutés à ces positions. Les valeurs de DL entre ces polymorphismes et les 4 autres sont significatives mais il est difficile de les considérer avec pertinence au vue des faibles effectifs de sujets mutés pour les positions -129, -1, 61 et 1199. Enfin, les loci C1236T, T-76A et G2677W sont en fort DL entre eux et en DL modéré avec C3435T. En effet, C1236T est en DL négatif quasi-total avec T-76A et en DL positif fort avec G2677W et plus modéré avec C3435T (Figure 34).

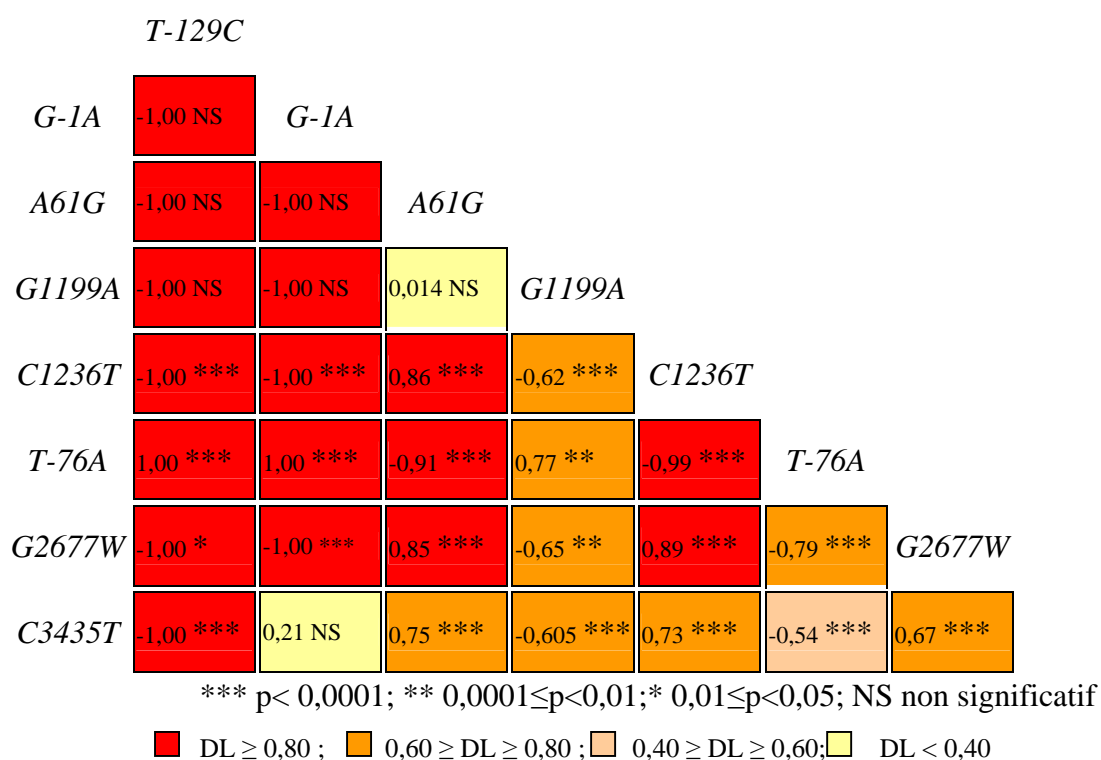


Figure 34 : Déséquilibres de liaison (DL) observés chez les parents (n=227) entre les 8 polymorphismes d'*ABCB1* étudiés.

A partir des 8 polymorphismes, 256 combinaisons haplotypiques hypothétiques peuvent être construites. En réalité, seules 25 sont estimées présentes dans notre population parentale dont 10 ont une fréquence supérieure à 3% (Tableau XX).

Tableau XX : Haplotypes estimés de fréquence supérieure à 3% dans notre population à partir des 8 polymorphismes d'*ABCB1* étudiés.

Haplotypes								Fréquence (IC 95%)
-129	-1	61	1199	1236	-76	2677	3435	
T	G	A	G	T	T	W	T	0,275 (0,23-0,32)
T	G	A	G	C	A	G	C	0,21 (0,17-0,25)
T	G	A	G	C	T	G	C	0,11
T	G	G	G	T	T	W	T	0,07 (0,04-0,095)
T	G	A	A	C	A	G	C	0,05 (0,03-0,07)
T	G	A	G	T	T	W	C	0,04 (0,02-0,06)
T	A	A	G	C	A	G	T	0,04 (0,02-0,06)
C	G	A	G	C	A	G	C	0,04 (0,02-0,06)
T	G	A	G	C	A	G	T	0,03 (0,01-0,055)
T	A	A	G	C	A	G	C	0,03 (0,01-0,05)

En gras : allèle muté

Si nous établissons les haplotypes les plus probables construits à partir des polymorphismes les plus fréquents, c'est à dire C1236T, T-76A, G2677W et C3435T, nous obtenons 12 haplotypes (Tableau XXI). Deux d'entre eux présentent des fréquences supérieures à 30%, confirmant le fort DL entre ces polymorphismes. L'haplotype le plus fréquent (35%) est celui contenant un allèle muté aux positions 1236, 2677 et 3435. L'haplotype avec mutation exclusivement en -76 vient en 2^e position avec une fréquence de 33%.

Tableau XXI : Haplotypes estimés dans notre échantillon à partir des 4 polymorphismes d'*ABCB1* les plus fréquents : C1236T, T-76A, G2677W et C3435T.

Haplotypes				Fréquence (IC 95%)
C1236T	T-76A	G2677W	C3435T	
T	T	W	T	0,35 (0,30-0,40)
C	A	G	C	0,33 (0,28-0,38)
C	T	G	C	0,11
C	A	G	T	0,08 (0,05-0,10)
T	T	W	C	0,045 (0,025-0,065)
C	A	W	C	0,025 (0,01-0,04)
T	T	G	C	0,02 (0,003-0,03)
C	A	W	T	0,02 (0,005-0,03)
T	T	G	T	0,01 (0,000-0,02)
C	T	W	T	0,007 (-0,004-0,02)
C	T	W	C	0,007 (-0,004-0,02)
T	A	W	T	0,003 (-0,003-0,008)

En gras : allèle muté

3) Discussion : Comparaison des fréquences observées avec celles décrites dans la littérature

La population étudiée étant d'origine lorraine et française depuis au moins 2 générations, nous la considérons comme représentative d'une population française de sujets sains. Anglicheau et al., ont déterminé les fréquences des polymorphismes T-129C, C1236T, G2677T/A et C3435T chez des patients français transplantés traités par cyclosporine [189]. Nous observons une différence avec notre population concernant la fréquence de 3435T qui est plus élevée dans la population malade ($\chi^2=6,83$; $p=0,03$). Ceci pourrait être un biais dû à la sélection d'un échantillon sur une pathologie.

D'après la littérature, la fréquence des variants et des haplotypes d'*ABCB1* peut varier en fonction de l'ethnie considérée [31, 77]. Sachant que certains polymorphismes sont associés à des modulations de la pharmacocinétique de médicaments, à des modifications de la réponse à des traitements, ou à la susceptibilité à des pathologies, certaines ethnies pourraient donc présenter un risque plus élevé d'effets indésirables, d'inefficacité médicamenteuse ou une prévalence plus élevée de certaines pathologies. S'il semble évident que la variabilité de la fréquence des polymorphismes est visible à l'échelle des continents [106], peu d'études se sont intéressées à cette variabilité au sein même des sous-populations européennes. C'est pourquoi nous avons comparé les fréquences observées dans notre population avec celles d'autres populations européennes supposées saines (Tableau XXII). Les fréquences génotypiques déterminées chez nos sujets pour T-129, G-1A, A61G, G1199A, C1236T, T-76A et G2677W ne varient pas significativement des fréquences observées dans d'autres populations européennes. Par contre, nous observons des différences pour C3435T. En effet, la fréquence du génotype 3435TT dans notre population est plus faible que celle des portugais ($p=0,0001$ [84] et $p=0,01$ [104]) et des tchèques ($p=0,007$ [190]) et tend à différer de celle observée chez des allemands et des russes ($p=0,03$ [182, 191]). Cette comparaison est rendue difficile par de faibles effectifs, une mauvaise connaissance des origines ethniques des populations et de leur statut physiopathologique. Par exemple, le génotype 3435TT est plus fréquent chez les patients présentant une colite ulcéraire que chez des sujets sains [97]. Elle mériterait des études supplémentaires dans des populations plus larges et mieux définies.

Concernant les haplotypes, nous n'avons pas pu comparer les fréquences observées dans notre population avec les quelques études existantes pour les raisons suivantes : nombre généralement faible de variants étudiés, façons différentes de présenter les haplotypes (par chromosome ou par individu) et présentations différentes du mutant G2677T/A (T et A poolés ou non).

Tableau XXII : Comparaison des fréquences génotypiques des polymorphismes d'*ABCB1* entre notre population parentale et d'autres populations caucasiennes (χ^2 , seules les valeurs significatives sont indiquées).

	Ref.	T -129 C			G/G	G-1A		A61G		G1199A			
		T/T	T/C	C/C		G/A	A/A	A/A	A/G	G/G	G/G	G/A	A/A
Volontaires sains français	Cette étude	0,92 (206)	0,08 (18)	0 (0)	0,85 (192)	0,14 (32)	0,004 (1)	0,83 (187)	0,16 (35)	0,01 (3)	0,89 (199)	0,10 (22)	0,01 (2)
Descendants d'européens (n=60)	HapMap-CEU ^a	0,90	0,10	0	0,73	0,27	0	0,80	0,20	0	0,93	0,07	0
Caucasiens, Allemands (n=188)	[71]	0,88	0,12	0	0,89	0,11	0	0,82	0,18	0,005	0,88	0,13	0
Allemands (n=461)	[182]	0,89	0,11	0	0,82	0,18	0	0,78	0,21	0,01	0,89	0,11	0
Polonais (n=139)	[192]	0,935	0,065	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Italiens Blancs (n=106)	[99]	0,94	0,06	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Portugais (n=100)	[84]& résultats non publiés	0,91	0,08	0,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,94 ^b	0,05 ^b	0,01 ^b

	Ref.	C/C	C1236T		T/T	T-76A		G/G	G2677T/A		WW	C3435T	
			C/T	T/T		T/A	A/A		GW	C/C		C/T	T/T
Volontaires sains français	Cette étude	0,33 (74)	0,49 (110)	0,18 (39)	0,30 (68)	0,49 (110)	0,21 (48)	0,28 (64)	0,52 (118)	0,19 (43)	0,275 (61)	0,52 (116)	0,20 (45)
Descendants d'européens (n=60)	HapMap-CEU ^a	0,35	0,52	0,13	0,32 ^c	0,50 ^c	0,18 ^c	0,33	0,55	0,12	nd	nd	nd
Caucasiens, Allemands (n=188)	[71]	0,38	0,49	0,13	0,32	0,46	0,22	nd	nd	nd	0,28	0,48	0,24
Allemands (n=461)	[182]	0,34	0,49	0,16	0,28	0,51	0,21	0,31	0,51	0,18	0,21	0,50	0,29
												$\chi^2=7,02$ p=0,03	
Tchèques (n=189)	[190]	0,32	0,40	0,21	0,41	0,42	0,16	0,30	0,48	0,22	0,21	0,45	0,34
												$\chi^2=9,87$ p=0,007	
Polonais (n=139)	[192]	0,35	0,47	0,18	nd	nd	nd	0,34	0,475	0,19	0,22	0,52	0,26
Italiens Blancs (n=106)	[99]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,35	0,42	0,23	0,26	0,55	0,19
Portugais (n=100)	[84] & résultats non publiés	0,27 ^b	0,55 ^b	0,18 ^b	nd	nd	nd	0,31	0,43	0,26	0,12	0,47	0,41
												$\chi^2=18,75$ p=0,0001	
Ecoissais (n=370)	[97]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,28	0,47	0,25	0,22	0,51	0,27
Espagnols (n=408)	[193]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,26	0,52	0,22
Russes (n=290)	[191]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,30	0,49	0,21	0,21	0,49	0,30
												$\chi^2=6,89$ p=0,03	
Caucasiens, UK (n=190)	[104]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,24	0,48	0,28
Portugais (n=100)	[104]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,22	0,42	0,36
												$\chi^2=9,06$ p=0,01	

^a NCBI's Entrez SNP database, ^b Ribeiro et al., non publié, ^c les allèles T et A sont inversés, nd: non déterminé

ABCB1 est très polymorphe et la fréquence de ses polymorphismes varie selon l'ethnie. Le premier objectif de cette analyse génomique était donc d'évaluer la fréquence de 8 polymorphismes d'*ABCB1* et des haplotypes associés dans notre échantillon de sujets supposés sains de la cohorte STANISLAS.

→ Nous montrons ainsi que :

1) les fréquences des allèles mutés dans la population étudiée (parents + enfants) sont respectivement de 0,04 ; 0,08 ; 0,09 ; 0,06 ; 0,41 ; 0,46 ; 0,44 et 0,46 pour les polymorphismes T-129C, G-1A, A61G, G1199A, C1236T, T-76A, G2677W et C3435T,

2) ces fréquences sont similaires à celles observées dans le sous groupe parental seul,

3) les fréquences dans le sous-groupe parents sont similaires à celles observées dans d'autres populations européennes, excepté pour C3435T,

4) ces polymorphismes sont en fort déséquilibre de liaison et un certain nombre d'haplotypes peut être défini.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Fundamental and Clinical Pharmacology* (ARTICLE N°1).

C. Associations des variants d'*ABCB1* aux taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques (ARTICLE N°2)

Comme nous l'avons souligné dans l'introduction, *ABCB1* pourrait être impliqué dans le transport et l'homéostasie du cholestérol. Des expériences *in vitro* et *ex vivo* ont montré qu'*ABCB1* pourrait faciliter la redistribution du cholestérol libre de la couche interne vers la couche externe de la bicouche lipidique [128] ou vers le reticulum endoplasmique [132] facilitant ainsi son estérification [133]. De plus, les polymorphismes d'*ABCB1* sont associés à des modulations de la pharmacocinétique de médicaments substrats de ce transporteur, à des modifications de la réponse à certains traitements, ou à la susceptibilité à des pathologies [31, 70]. Notre deuxième objectif a donc consisté à évaluer dans notre échantillon de sujets supposés sains si les polymorphismes d'*ABCB1* peuvent influencer les taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques.

Pour chacun des 8 polymorphismes étudiés, les génotypes ont été associés avec le cholestérol total, les triglycérides, l'apoA1, l'apoB, l'apoC3, l'apoE, le HDL-cholestérol et le LDL-cholestérol plasmatiques. Les variables d'ajustement sexe, âge, génération, tabac, IMC, contraceptifs oraux et thérapie hormonale substitutive chez les femmes ont été incluses dans le modèle. Après avoir testé les différentes corrélations dans la population totale, nous avons répété l'étude chez les hommes et chez les femmes séparément dans l'objectif de détecter des corrélations sexe-dépendantes. Enfin, nous nous sommes intéressés aux associations entre haplotypes et taux de lipides plasmatiques.

Pour les polymorphismes C1236T, T-76A, G2677W et C3435T, les études d'association ont été faites en 3 groupes de génotypes. Le nombre d'individus homozygotes mutés pour les polymorphismes T-129C, G-1A, A61G et G1199A étant inférieur à 5, les analyses pour ces polymorphismes ont été faites en groupant les hétérozygotes et les homozygotes mutés et en les comparant avec les homozygotes sauvages. Pour les associations entre polymorphismes d'*ABCB1* et taux de lipides, comme le nombre de tests réalisés est élevé, seuls les $p \leq 0,02$ sont considérés comme significatifs ($p \leq 0,05$ = tendance).

1) Polymorphisme C3435T

Nous observons une association fortement significative entre le polymorphisme C3435T et les taux plasmatiques d'ApoA1 (Figure 35). Par contre, nous ne mettons en évidence aucune autre association, y compris avec le HDL cholestérol.

Dans la population totale, les homozygotes pour l'allèle sauvage ont un taux moyen d'ApoA1 de $1,61 \pm 0,03$ mmol/L contre $1,64 \pm 0,03$ pour les hétérozygotes et $1,72 \pm 0,03$ pour les homozygotes pour l'allèle T. Les homozygotes pour 3435T ont ainsi des taux d'environ 6,8% plus élevés que les homozygotes sauvages ($p_{\text{cod}}=0,005$). Cette association est également significative chez les femmes ($p_{\text{cod}}=0,009$) et tend à l'être chez les hommes ($p_{\text{cod}}=0,05$; $p_{\text{all}}=0,02$).

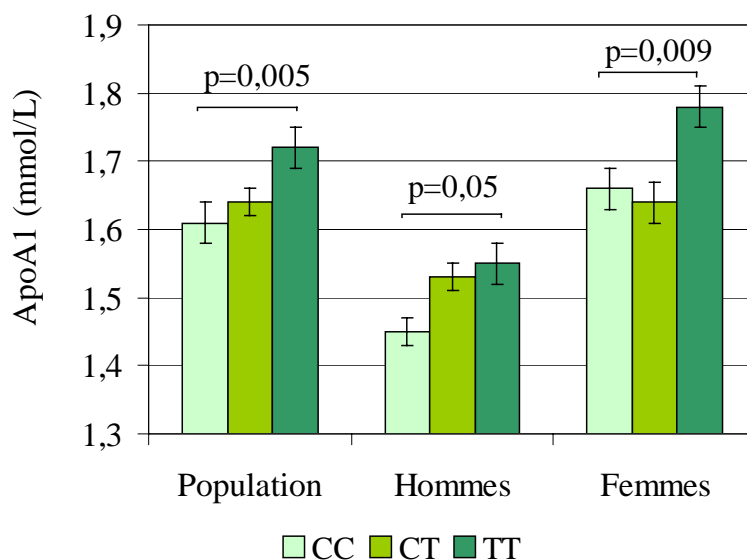


Figure 35 : Taux d'Apolipoprotéine A1 plasmatique en fonction du génotype pour *ABCB1* C3435T dans l'échantillon STANISLAS étudié (modèle codominant).

Les autres associations significatives observées entre polymorphismes et variables biologiques ne concernent que le sous-groupe femmes de l'échantillon STANISLAS considéré et sont présentées ci-après.

2) Polymorphismes T-76A, C1236T et G2677T/A

En utilisant un modèle allélique, nous avons observé de nombreuses associations entre les polymorphismes T-76A, C1236T ou G2677T/A et le cholestérol total, LDL, l'ApoB, les TG et/ou l'ApoC3 (Figure 36). Ces associations sont significatives exclusivement chez les femmes. Nous ne les observons ni dans la population totale ni dans le sous-groupe des hommes.

Il apparaît que les femmes porteuses d'au moins un allèle muté en position T-76A ont des concentrations plus élevées de cholestérol total (TT: $5,03 \pm 0,13$, TA: $5,59 \pm 0,09$ et AA: $5,55 \pm 0,15$; [pall=0.004]), de cholestérol LDL (TT: 2,75 (2,63-2,87), TA: 3,27 (3,19-3,35) et AA: 3,15 (3,00-3,30); pall=0,02]) et d'ApoB (TT: 0,82 (0,79-0,85), TA: 0,95 (0,93-0,97) and AA: 0,96 (0,93-1,00); [pall=0,002]). De plus, les porteuses d'au moins un allèle muté ont tendance à avoir des valeurs plus élevées d'ApoC3 (TT: 75,3 (71,6-79,1, TA: 84,5 (81,4-87,7) et AA: 89,7 (83,8-96,0) [pall=0,04]) et de TG (TT: 0,86 (0,80-0,92), TA: 0,96 (0,92-1,01) et AA: 1,05 (0,96-1,14) [pall=0,05]) (Figure 36 A).

De plus, les femmes portant le variant 1236T ont des taux plus faibles de cholestérol total (CC: $5,58 \pm 0,10$, CT: $5,46 \pm 0,10$ et TT: $4,99 \pm 0,18$; [pall=0,01]) et d'ApoB (CC: 0,95 (0,92-0,98), CT: 0,93 (0,90-0,95) et TT: 0,80 (0,77-0,84); [pall=0,02]). Elles auraient également moins de LDL (CC: 3,20 (3,09-3,30), CT: 3,19 (3,11-3,28) et TT: 2,63 (2,48-2,79); pall=0,03]) (Figure 36 B).

Enfin, les porteuses du variant 2677W tendent à présenter des valeurs plus faibles d'ApoB (GG: 0,95 (0,92-0,98), GW: 0,92 (0,90-0,95) et WW: 0,83 (0,79-0,87); [pall=0,04]), d'ApoC3 (GG: 89,8 (86,0-93,8, GW: 80,1 (76,6-83,6) et WW: 78,9 (75,1-82,9) [pall=0,05]), de LDL (GG: 3,21 (3,10-3,32), GW: 3,15 (3,08-3,23) et WW: 2,74 (2,58-2,91); pall=0,05]) et de cholestérol total (GG: $5,58 \pm 0,11$, GW: $5,44 \pm 0,09$ et WW: $5,11 \pm 0,20$; [pall=0,06]) (Figure 36 C).

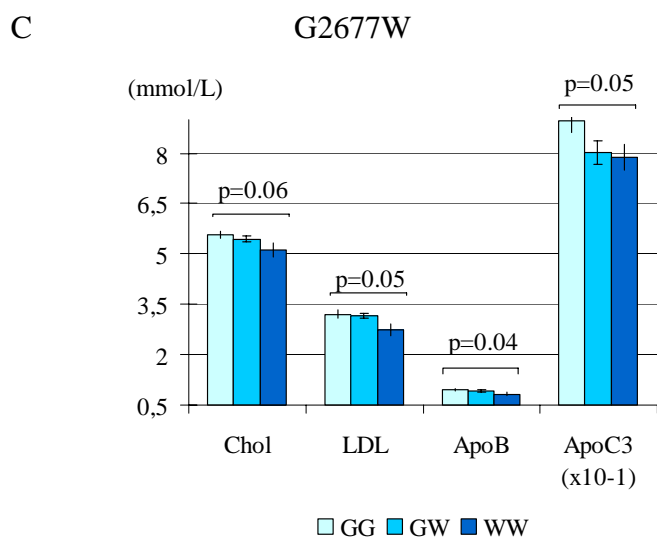
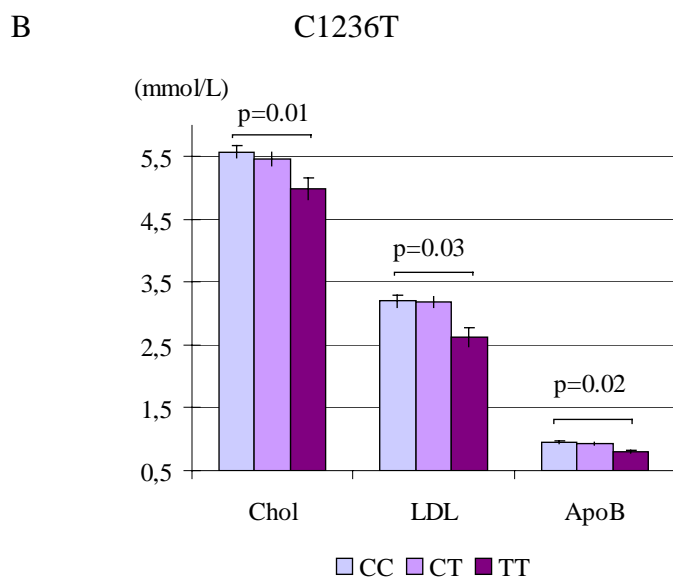
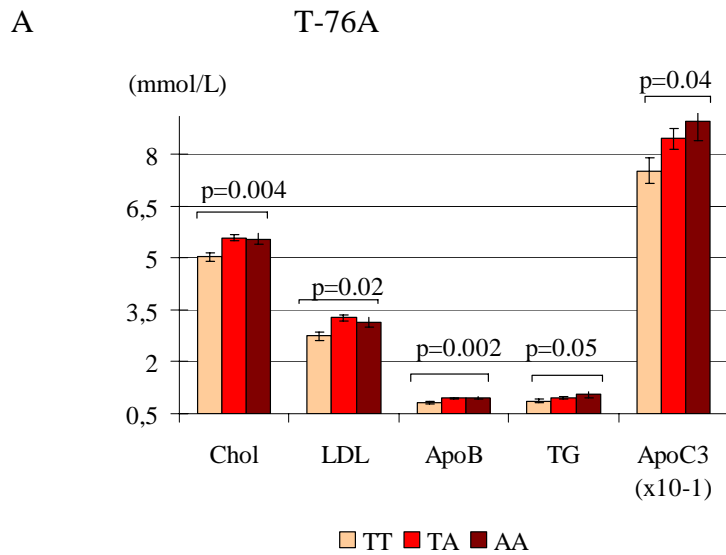


Figure 36 : Taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques en fonction du génotype pour *ABCB1* T-76A (A) C1236T (B) et G2677W (C) chez les femmes (modèle allélique).

3) Polymorphisme G-1A

Aucune association n'a été observée entre le polymorphisme G-1A et les variables biologiques chez les hommes et dans la population totale. Cependant, en comparaison aux homozygotes pour l'allèle sauvage (n=156), les femmes porteuses d'un allèle muté (n=31) auraient des taux de cholestérol plus élevés ($5,78 \pm 0,15$ versus $5,34 \pm 0,09$; $p=0,02$), tout comme le LDL cholestérol ($3,40$ ($3,26-3,55$) versus $3,03$ ($2,95-3,11$); $p=0,03$) et l'ApoB ($0,99$ ($0,95-1,03$) versus $0,90$ ($0,88-0,92$); $p=0,04$) (Figure 37).

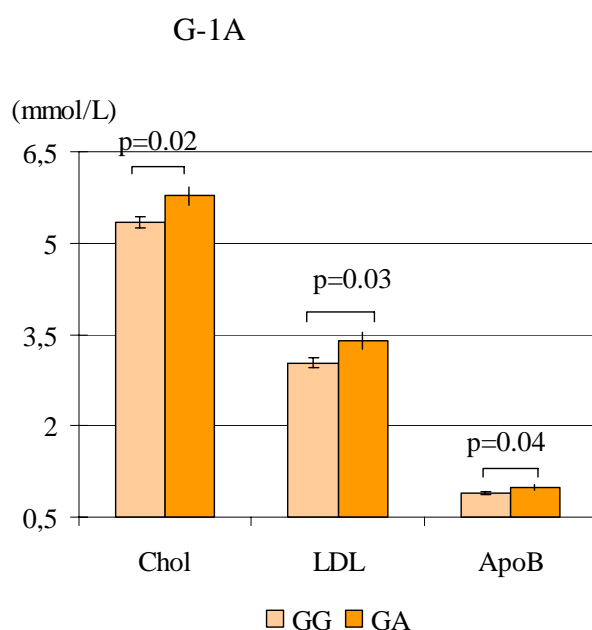


Figure 37 : Taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques en fonction du génotype pour *ABCB1* G-1A chez les femmes.

4) Polymorphismes T-129C, A61G, G1199A

Aucune association significative n'a été observée entre les polymorphismes T-129C, A61G ou G1199A et les variables plasmatiques étudiées. Ceci pourrait s'expliquer notamment par les faibles effectifs de sujets porteurs d'au moins un allèle muté (respectivement 31, 60 et 42).

5) Haplotypes

De nombreuses études suggèrent que l'analyse d'haplotypes serait plus informative que l'analyse de polymorphismes isolés [31, 106]. De plus, il n'est pas clairement défini si ce sont les polymorphismes eux-mêmes, ou des polymorphismes avec lesquels ils sont en déséquilibre de liaison, qui sont responsables des associations observées.

C1236T est en DL négatif fort avec T-76A, en déséquilibre positif fort avec G2677W et positif modéré avec C3435T. De plus, G-1A est en DL positif total avec T-76A et en DL négatif total avec C1236T et G2677W. Compte tenu de ces DL et des associations significatives observées individuellement avec les polymorphismes G-1A, C1236T, T-76A, G2677W et C3435T, nous avons effectué des tests de corrélation entre les haplotypes restreints à ces 5 polymorphismes et les paramètres plasmatiques afin de mettre éventuellement en évidence des effets additifs ou de voir si un seul polymorphisme suffit à expliquer l'effet d'un haplotype.

Les résultats précédents ne montrent que des tendances avec les polymorphismes G2677W et G-1A. Soit ces associations pourraient devenir significatives si l'effectif étudié était plus important, soit ces tendances reflètent l'effet d'autres polymorphismes. Ainsi, G-1A pourrait refléter l'effet de T-76A ou de C1236T. Malheureusement, nous ne pouvons le déterminer ici car l'effectif des femmes porteuses de chaque haplotype est trop faible.

A partir des 5 polymorphismes associés précédemment, ou tendant à être associés, avec l'un des paramètres plasmatiques étudiés, 15 haplotypes sont observés dans notre population parentale. Dix ont une fréquence supérieure à 1% et le plus fréquent, GTTWT (0,34) est considéré comme l'haplotype de référence (Tableau XXIII).

Nous avons effectué l'analyse d'association avec les lipides sur la population globale sans la séparer en fonction du sexe car les effectifs de chaque haplotype auraient alors été trop faibles. Concernant le cholestérol total, le LDL, l'ApoB et l'ApoC3, il n'y a pas de différence entre le modèle sans effet haplotypique et le modèle haplotypique à 5 polymorphismes (résultats non présentés). L'analyse haplotypique n'est donc pas plus informative que l'analyse individuelle des polymorphismes puisque nous n'observons pas plus de corrélations qu'avec les études de polymorphismes seuls.

Par contre, concernant l'ApoA1, il existe une différence significative entre modèle haplotypique et modèle non-haplotypique ($p=0,009$). Ainsi, l'haplotype GCAGC est significativement associé à une diminution de la concentration en ApoA1 comparée à

l'haplotype de référence GTTWT ($p=0,002$) (Tableau XXIII). De plus, la restriction de l'haplotype aux seuls polymorphismes G2677W et C3435T serait aussi informative que l'haplotype issu des 5 polymorphismes. En effet, le modèle haplotypique à 2 polymorphismes n'est pas différent du modèle à 5 polymorphismes ($p=0,24$) et les porteurs de l'haplotype GC ont des taux significativement diminués d'ApoA1 en comparaison aux porteurs WT (GC : $m=0,78$ et IC 95% (0,54-1,01) et WT 0,82 (0,58-1,05) ; $p=0,05$).

Tableau XXIII : Taux d'ApoA1 dans l'échantillon global en fonction des haplotypes obtenus en considérant les polymorphismes G-1A, C1236T, T-76A, G2677W et C3435T.

Haplotype	Fréquence (%)	beta	se	p
G T T W T	34,2	0,81	0,12	référence
G C A G C	28,1	-0,07	0,02	0,002
G C T G C	10,7	-0,03	0,04	0,40
G C A G T	7,6	0,07	0,04	0,07
A C A G C	4,9	0,02	0,05	0,66
G T T W C	4,9	-0,04	0,07	0,57
G C A W C	2,6	-0,05	0,06	0,45
G C A W T	1,7	-0,02	0,14	0,86
G T T G C	1,5	0,10	0,12	0,42
G T T G T	1,1	0,15	0,14	0,30

6) Discussion

(a) Polymorphismes d'ABCB1 et expression et fonction du transporteur

Nous avons mis en évidence dans cette étude des associations entre 5 polymorphismes d'*ABCB1* et les taux de lipides plasmatiques. Comme nous l'avons développé dans l'introduction, ces polymorphismes ont été associés avec une modulation de l'expression et/ou de l'activité du transporteur dans les tissus humains. De plus, certains ont été impliqués dans les variations de la pharmacocinétique de substrats médicamenteux et dans la variabilité de la réponse biologique à ces traitements. Enfin, quelques variants sont associés à la susceptibilité à des pathologies spécifiques [31, 70].

Nous montrons ici qu'il existe une association significative entre les génotypes C3435T et les taux plasmatiques d'ApoA1 tous sexes confondus. Les sujets porteurs d'au moins un allèle T ont des taux d'ApoA1 plus élevés que les porteurs de l'allèle sauvage C. L'ApoA1 associée aux HDL est impliquée dans le transport reverse du cholestérol des tissus périphériques vers

le foie. L'allèle muté serait donc associé à un profil lipidique favorable. C3435T est le polymorphisme d'ABCB1 le plus étudié à l'heure actuelle. L'allèle muté 3435T a été associé à une diminution de l'expression d'ABCB1 dans le duodénum [71, 84], dans le rein [31] et dans les lymphocytes [85]. Ainsi les homozygotes pour l'allèle T présenteraient une expression d'ABCB1 deux fois plus basse que les homozygotes pour l'allèle C [71]. Cependant, d'autres études montrent un effet inverse c'est-à-dire une augmentation de l'expression d'ABCB1, dans les entérocytes duodénaux par exemple [83]. Le mécanisme moléculaire responsable de l'effet de C3435T est mal élucidé. En effet, C3435T est un polymorphisme silencieux de l'exon 26 qui n'entraîne pas de changement d'acide aminé. Selon certains auteurs, comme cette mutation à la position 3435 est silencieuse et n'est pas située dans le promoteur, elle n'influencerait donc pas l'expression de la protéine de façon directe [194]. Ces auteurs préconisent de considérer plutôt les haplotypes et proposent que l'effet observé serait plutôt dû à G2677T/A [195]. Cependant, nous montrons ici que les 2 polymorphismes ont des effets différents. Tandis que C3435T est fortement associé avec l'ApoA1, G2677W tendrait plutôt à être associé avec les paramètres pro-athérogènes tels que le cholestérol total ou l'ApoB. Généralement, lorsque des variations sont observées dans l'expression d'un gène, les SNPs responsables sont situés dans la région codante et entraînent la substitution d'un acide aminé. Cependant, d'autres polymorphismes peuvent être impliqués et les polymorphismes synonymes ne sont pas toujours sans effet. L'expression d'un ARNm peut être régulée soit par des polymorphismes (*cis acting*) soit par des facteurs de transcription (*trans acting*). Wang et al., [86] montrent dans des échantillons de foie qu'il existe une régulation de l'expression de MDR1 par un polymorphisme. Après des études de transfection *in vitro* de toutes les combinaisons possibles de C1236T, G2677T et C3435T, ils ont montré que le variant C3435T, bien qu'il ne soit pas situé dans une région codante, serait le principal polymorphisme fonctionnel affectant le taux d'ARNm en diminuant la stabilité de l'ARNm d'ABCB1 [86]. D'autre part, Kimchi-Saraty et al., proposent que, en comparaison à l'allèle sauvage, l'allèle muté 3435T est associé à des taux d'ARNm et de protéine similaires mais également à une altération de la conformation de la protéine qui affecterait les sites d'interaction avec les substrats/inhibiteurs [196].

Peu de choses sont connues sur T-76A, un polymorphisme de l'intron 16 situé au niveau d'un point de jonction entre introns [71]. Nous montrons ici que les femmes porteuses d'au moins un allèle muté en position -76 ont des concentrations plus élevées de cholestérol total, de LDL et d'ApoB que les non-porteuses.

Les femmes porteuses des allèles sauvages en position 1236 ou 2677 semblent présenter des variations allant également dans ce sens. Comme C3435T, C1236T est une mutation

silencieuse de l'exon 12 dont l'effet n'est pas clairement établi. Plusieurs explications existent pour justifier l'activité observée pour ce polymorphisme tel que le DL avec un autre polymorphisme fonctionnel, un effet sur l'épissage ou le contrôle de la traduction. La substitution d'un G par un T ou un A en position 2677 entraîne la substitution d'une alanine hydrophobe par une serine ou une thréonine hydrophile au niveau du deuxième domaine transmembranaire ce qui pourrait affecter le site d'interaction [61].

Enfin, d'après nos résultats, les femmes porteuses de l'allèle muté en position G-1A auraient des taux de molécules pro-athérogènes (cholestérol, LDL et ApoB) plus forts que les non-porteuses. La variation G-1A est localisée au niveau du nucléotide qui précède directement le codon *start* ATG de début de la traduction [71] et pourrait donc affecter cette traduction. Cependant, l'effet observé ici entre G-1A et les taux de lipides pro-athérogènes pourrait également refléter l'effet d'un autre polymorphisme puisque nous avons montré que G-1A est en DL négatif total avec C1236T et G2677T/A et en DL positif total avec T-76A.

(b) Polymorphismes d'ABCB1 et réponse aux traitements médicamenteux influençant le métabolisme lipidique

Nos résultats ne permettent pas de conclure quant au(x) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les génotypes d'*ABCB1* modulerait le taux de lipides. Le rôle d'*ABCB1* dans le transport du cholestérol est à l'heure actuelle toujours controversé même si, comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreux points supportent cette hypothèse. La littérature a montré l'existence d'associations significatives entre certains polymorphismes d'*ABCB1* et la modulation de la baisse du cholestérol sous statines et l'hypercholestérolémie secondaire aux anti-rétroviraux [72]. Des études récentes proposent qu'en plus de moduler la pharmacocinétique des statines et des anti-rétroviraux, les polymorphismes d'*ABCB1* pourraient expliquer une partie de l'efficacité ou des effets indésirables de ces molécules par un impact direct sur les taux de lipides indépendamment de la présence de ces médicaments [90, 92, 121].

Ainsi, de nombreux traitements anti-rétroviraux, substrats ou modulateurs d'*ABCB1*, ont des effets secondaires au niveau des paramètres lipidiques. Par exemple, un traitement d'un an par efavirenz entraîne une augmentation de la concentration plasmatique de cholestérol total, du LDL et du HDL [90]. Cette augmentation serait différente en fonction du génotype du patient pour *ABCB1*, notamment pour C3435T [90]. En effet, l'augmentation du HDL n'existe que si

l'individu possède au moins un allèle C3435. Cette association pourrait être liée à une modulation du taux circulant de médicament. Cependant, Alonso-Villaverde et al., formulent l'hypothèse selon laquelle il existerait une relation directe entre le polymorphisme d'*ABCB1* et la concentration plasmatique en HDL.

De nombreuses études ont montré que les polymorphismes d'*ABCB1* influencent la réponse aux statines [91-94]. Elles rapportent des associations significatives entre génotypes d'*ABCB1* et taux de lipides chez des patients hypercholestérolémiques avant instauration d'un traitement hypolipémiant et proposent que les polymorphismes d'*ABCB1* pourraient contribuer de façon importante aux taux de base de cholestérol total et de LDL cholestérol plasmatiques [92, 121]. Kajinami K et al., [92], rapportent en effet que, avant traitement par statine de femmes hypercholestérolémiques (n=138), les porteuses d'au moins un variant de l'allèle 2677 présentent des taux significativement plus élevés de LDL que les non porteuses, cela n'étant pas visible chez les hommes. De plus, Rodrigues et al., [121], ont étudié l'effet des polymorphismes G2677T/A et C3435T sur les taux de lipides plasmatiques avant et après traitement par atorvastatine de 69 individus hypercholestérolémiques brésiliens d'origine européenne. Ils ne parviennent pas, contrairement à Kajinami K et al., à mettre en évidence d'association significative entre les 2 polymorphismes pris isolément et les taux de lipides. Ils présumant que leur échantillon est au moins 2 à 3 fois trop faible pour obtenir des différences significatives. Cependant, ils montrent que les porteurs de l'haplotype 2677T/3435T ont des taux de cholestérol total et LDL de base (c'est à dire avant traitement) plus élevés que les non porteurs.

Dans notre étude sur des sujets sains, les résultats diffèrent de ce qu'observent Kajinami et al., et Rodrigues et al., chez leurs individus hyperlipémiques avant traitement. Notamment, dans notre échantillon, les allèles mutés en position 3435 et 2677 seraient plutôt associés à un effet anti-athérogène. Les explications peuvent être les différences de taille des échantillons ainsi que leur composition : sujets sains *versus* hyperlipémiques. En effet, la concentration en lipides, notamment en cholestérol, pourrait moduler l'activité du transporteur ABCB1 [126].

Nakamura et al., ont décrit des taux plus élevés d'ARNm d'*ABCB1* dans des entérocytes duodénaux de japonais porteurs du génotype 3435TT [83]. Rodrigues et al., [121] suggèrent donc que les taux plus élevés de LDL et de cholestérol total observés dans leur étude et dans celle de Kajinami et al., [92] chez les porteurs de l'haplotype 2677T-3435T seraient liés à une augmentation de l'expression et de l'activité d'*ABCB1* chez ces sujets. Bien que ces auteurs n'excluent pas que d'autres molécules régulant le trafic du cholestérol intracellulaire pourraient être impliquées, l'implication d'*ABCB1* dans le transport du cholestérol membranaire vers le réticulum où il est estérifié expliquerait les taux plus élevés de

cholestérol total et de LDL trouvés chez les porteurs de l'haplotype *ABCB1* 2677T-3535T. En effet, l'augmentation de la p-gp associée à certains variants pourrait résulter en une augmentation du contenu intracellulaire en esters de cholestérol qui induirait une réduction de la synthèse du cholestérol et de la capture des LDL médiés respectivement par l'HMCoA Réductase et le récepteur aux LDL et augmenterait le taux de cholestérol plasmatique [121]. De plus, la modification de la disponibilité du cholestérol estérifié pourrait moduler la biodisponibilité du cholestérol libre pour son efflux hors de la cellule via ABCA1 [128]. Si, à l'inverse de Rodrigues et al., nous considérons que C3435T diminuerait, plutôt que augmenterait, l'activité du transporteur *ABCB1* comme le propose d'autres auteurs [71], le raisonnement de ces auteurs devient applicable à nos résultats.

(c) Effet sexe-dépendant des polymorphismes d'ABCB1

Dans notre étude, la majorité des associations significatives entre génotypes d'*ABCB1* et taux de lipides plasmatiques sont observées chez les femmes. Nous avons confirmé ces résultats en testant les interactions entre génotype et sexe sur la détermination des taux de lipides. Comme attendu, nous n'observons aucune interaction entre le sexe et C3435T. Par contre, lorsque l'on considère le cholestérol, l'ApoB et les taux de LDL, il y a une interaction significative entre le sexe et T-76A ($p < 0,003$) ; C1236T ($p < 0,004$) ; G2677W ($p < 0,04$) et G-1A ($p < 0,01$).

Ces différences en fonction du sexe avaient déjà été rapportées par Kajinami et al., [92]. En effet, dans leur étude, l'association entre le génotype de C3435T et la modulation de la réponse des LDL aux statines n'était significative que chez les femmes. Une explication possible serait la modulation de l'activité d'*ABCB1* par les hormones sexuelles. Bien que certains auteurs ne mettent pas en évidence de modulation de l'expression d'*ABCB1* par le sexe [197, 198], d'autres proposent une modulation de l'expression et ou de l'activité du transporteur par les hormones sexuelles féminines dont la progestérone. Ainsi, des études in vitro suggèrent l'existence d'un site spécifique de liaison de la progestérone sur *ABCB1* qui modulerait l'activité du transporteur [199, 200]. De plus, la thérapie hormonale peut moduler in vitro ou ex vivo l'activité d'*ABCB1*, même s'il existe des divergences quand à l'effet positif ou négatif de cette modulation [201, 202]. Fröhlich et al., [202] ont étudié l'effet des progestatifs utilisés comme contraceptifs oraux ou en traitement hormonal substitutif sur l'activité du transporteur. Ils ont montré un effet inhibiteur des progestatifs sur l'activité de la protéine. A l'inverse, Kim et al., [201] ont montré que ces hormones stéroïdes féminines induiraient l'expression de la protéine et d'ARNm et qu'elles stimuleraient l'activité catalytique ATPase.

ABCB1 pourrait être impliqué dans le transport et l'homéostasie du cholestérol. De plus, les polymorphismes d'*ABCB1* pourraient affecter l'expression et l'activité du transporteur. Notre deuxième objectif a donc consisté à évaluer dans notre échantillon de sujets supposés sains si les polymorphismes d'*ABCB1* peuvent influencer les taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques.

➔ Nous montrons ici que les variants d'*ABCB1* peuvent moduler les concentrations plasmatiques en lipides et apolipoprotéines chez le sujet sain :

1) la présence d'un allèle muté en position 3435, 1236, 2677 et la présence de l'allèle sauvage en position -76 et -1 sont associés avec un profil anti-athérogène. En effet :

a) 3435T est associé à un taux d'ApoA1 plasmatique plus élevé que l'allèle sauvage,

b) l'allèle sauvage T-76 et l'allèle muté 1236T, et éventuellement 2677W et G-1, sont associés à une diminution des taux de molécules pro-athérogènes, c'est à dire cholestérol total, LDL, ApoB, TG et/ou ApoC3 chez les femmes,

2) il existe un effet sexe-dépendant pour certains de ces polymorphismes,

3) l'analyse haplotypique n'est pas plus informative que l'analyse individuelle de ces polymorphismes, exceptée pour le taux d'ApoA1.

Ce travail a fait l'objet d'une rédaction actuellement soumise pour publication au journal *Atherosclerosis* (ARTICLE N°2).

D. Association des variants d'*ABCA1* et d'*ABCG8* aux taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines

D'autres transporteurs de la famille des ABC sont bien connus pour leur implication dans l'homéostasie des lipides, notamment *ABCA1* et *ABCG8*. Les gènes codants ces 2 transporteurs sont polymorphes et certains de ces polymorphismes sont clairement associés d'après la littérature à des variations des taux de lipides plasmatiques et/ou à une modification de la susceptibilité à certaines pathologies cardiovasculaires. Certains génotypes d'*ABCA1* sont ainsi associés à des variations des taux d'HDL et d'ApoA1 plasmatiques tandis que des polymorphismes d'*ABCG8* sont associés à une modulation des taux de cholestérol et de LDL.

L'objectif de ce chapitre était donc d'évaluer dans notre population les associations, dont celles connues dans la littérature, entre quelques polymorphismes majeurs de ces 2 transporteurs et les taux de lipides plasmatiques afin de pouvoir comparer leurs effets à ceux observés en présence de certains génotypes d'*ABCB1* et d'évaluer le potentiel d'*ABCB1* comme nouveau marqueur génétique du risque cardiovasculaire. Les polymorphismes considérés dans ce travail sont présentés dans le Tableau XXIV.

Tableau XXIV : Polymorphismes d'intérêt des gènes codant *ABCA1* et *ABCG8*.

Gène	SNP ^a	SNP ID	Désordre associé à l'allèle muté	Fréquence Caucasiens ^b
<i>ABCA1</i>	ARG219lys (R219K)	rs2230806	Associé à une augmentation légère du HDL et à une prévalence plus faible de maladie des artères coronaires [203]	0,16
<i>ABCA1</i>	ILE883met (I883M)	rs4149313	Associé à des taux plus élevés de HDL [204]	0,13
<i>ABCA1</i>	LYS1587arg (K1587R)	rs2230808	LYS: Associé à des taux plus bas d'ApoA1 [49]	0,84
<i>ABCA1</i>	C-7t	rs1800977	Pas de données significatives	0.358
<i>ABCA1</i>	G-395c	rs2246293	Pas de données significatives	Pas de données
<i>ABCA1</i>	C-564t	rs2422493	Effet non clairement déterminé. Associé à une augmentation du risque de maladie cardiovasculaire infra-clinique [203] mais également à une diminution du risque de maladie coronaire [204]	Pas de données
<i>ABCG8</i>	THR400lys (T400K)	rs4148217	Diminution plus faible du cholestérol total et du LDLc chez les hommes sous régime diététique [57]	0,25
<i>ABCG8</i>	TYR54cys (T54C)	rs4148211	Diminution plus faible du cholestérol total chez les femmes sous régime diététique [57]	0,38
<i>ABCG8</i>	ALA632val (A632V)	rs6544718	Associé avec des variations des taux de cholestérol total, de LDL et d'ApoB chez les faibles consommateurs de cholestérol [205]	0,21

^a L'allèle sauvage est figuré en lettres capitales et l'allèle muté en minuscule.

^b Fréquence de l'allèle muté chez les Caucasiens (HapMap)

Dans une première étape, nous avons calculé la fréquence des 6 polymorphismes d'*ABCA1* et des 3 d'*ABCG8* dans l'échantillon de la cohorte STANISLAS étudié pour *ABCB1*. Puis, nous avons réalisé des études d'association afin de déterminer si ces polymorphismes étaient associés à un ou plusieurs paramètres lipidiques dans notre échantillon comme le laissait prévoir la littérature.

(a) Fréquences des polymorphismes d'*ABCA1* et *G8*

Les fréquences observées des allèles mutés sont respectivement de 0,24 ; 0,14 ; 0,77 ; 0,39 ; 0,49 et 0,49 pour les polymorphismes ARG219LYS, ILE883MET, LYS1587ARG, C-7t, G-395C et C-564T d'*ABCA1* et de 0,21 ; 0,40 et 0,20 pour THR400LYS, TYR54CYS et ALA632VAL d'*ABCG8*. Le Tableau XXV présente les fréquences génotypiques correspondantes.

Tableau XXV : Fréquences génotypiques des polymorphismes d'*ABCA1* et d'*ABCG8* dans l'échantillon de la cohorte STANISLAS étudié.

Gène	SNP	SNP ID	n	Fréquence génotypique ^a		
				11	12	22
<i>ABCA1</i>	R219K	rs2230806	370	0,57	0,37	0,06
<i>ABCA1</i>	I883M	rs4149313	369	0,745	0,23	0,03
<i>ABCA1</i>	K1587R	rs2230808	367	0,06	0,35	0,59
<i>ABCA1</i>	C-7t	rs1800977	355	0,37	0,47	0,16
<i>ABCA1</i>	G-395c	rs2246293	363	0,27	0,49	0,245
<i>ABCA1</i>	C-564t	rs2422493	360	0,26	0,5	0,24
<i>ABCG8</i>	T400K	rs4148217	366	0,63	0,32	0,05
<i>ABCG8</i>	T54C	rs4148211	366	0,37	0,45	0,18
<i>ABCG8</i>	A632V	rs6544718	367	0,645	0,32	0,02

^a 1=allèle sauvage et 2=allèle muté.

A noter, nous souhaitons également génotyper le polymorphisme Q604E (rs6720173) du gène codant le transporteur *ABCG5*. Ce transporteur forme en effet un hétérodimère avec *ABCG8* et certains de ses variants, dont Q604E, peuvent entraîner le même type d'anomalies que les polymorphismes d'*ABCG8*. Cependant, nous n'avons pas été en mesure d'interpréter le génotypage des individus pour ce polymorphisme malgré une répétition de l'essai. Il semble que le kit prêt à l'emploi fourni par la société Applied Biosystems ne soit pas parfaitement au point pour ce polymorphisme.

(b) Associations entre polymorphismes d'ABCA1 et d'ABCG8 et les variables biologiques étudiées

Nous avons réalisé des études d'association en fonction du sexe entre les génotypes observés et les taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines mesurés au point 2 chez les 371 individus étudiés. Lorsque la fréquence des homozygotes mutés ou sauvages était inférieure à 10% (c'est-à-dire pour R219K, I883M, T400K et A632V et pour K1587R) les homozygotes minoritaires ont été groupés avec les hétérozygotes. Les variables d'ajustement incluses dans le modèle sont les mêmes qu'avec *ABCB1* soit : sexe, âge, génération, tabac, IMC, contraceptifs oraux et thérapie hormonale substitutive chez les femmes.

Comme avec *ABCB1*, la majorité des associations significatives sont observées chez les femmes exclusivement. Les Tableaux XXVI et XXVII présentent pour les femmes les associations entre polymorphismes et paramètre biologique ($p < 0,10$).

Tableau XXXI : Associations entre polymorphismes d'ABCA1 et paramètres biologiques chez les femmes (3 groupes).

SNP	Paramètre biologique	11	12	22	p all
<i>ABCA1</i>	APOE	36,04 (34,87-37,25)	36,70 (35,38-38,06)	41,18 (39,3-43,16)	0,01
C-564T	APOA1	1,64 (1,6-1,67)	1,71 (1,68-1,73)	1,64 (1,61-1,68)	0,16
<i>ABCA1</i>	APOE	36,05 (34,81-37,33)	36,61 (35,34-37,92)	40,88 (39,05-42,79)	0,02
G-395C	APOA1	1,64 (1,6-1,68)	1,7 (1,68-1,73)	1,63 (1,6-1,66)	0,13
<i>ABCA1</i>	APOE	35,44 (34,31-36,61)	37,89 (36,44-39,39)	41,61 (39,04-44,35)	0,03
C-7T	TG	0,86 (0,81-0,91)	0,95 (0,9-1)	1,07 (0,98-1,18)	0,04
	APOC3	78,82 (75,27-82,53)	80,77 (77,96-83,68)	94,73 (89,23-100,57)	0,01
	APOA1	1,67 (1,64-1,7)	1,69 (1,66-1,71)	1,64 (1,6-1,69)	0,69

Tableau XXXII : Associations entre polymorphismes d'ABCA1 et d'ABCG8 et paramètres biologiques chez les femmes (2 groupes).

SNP	Paramètre biologique	11 (sauf K1587R : 11+12)	12+22 (sauf K1587R : 22)	p
<i>ABCA1</i>	APOE	34,70 (33,38-36,06)	39,46 (38,32-40,62)	0,005
K1587R	APOC3	75,39 (72,01-78,93)	87,10 (84,18-90,12)	0,01
	Cholestérol	5,20 (0,14)	5,46 (0,08)	0,08
	HDL	1,63 (1,58-1,67)	1,73 (1,69-1,76)	0,07
	APOA1	1,63 (1,6-1,66)	1,69 (1,66-1,71)	0,12
<i>ABCA1</i>	LDL	3,16 (3,07-3,25)	2,92 (2,82-3,02)	0,06
R219K	APOA1	1,65 (1,63-1,68)	1,68 (1,65-1,71)	0,49
<i>ABCG8</i>				
A632V	HDL	1,66 (1,62-1,7)	1,75 (1,71-1,8)	0,09

Nous ne pouvons mettre en évidence aucune association significative entre polymorphismes d'ABCA1 et taux d'ApoA1. Les 2 polymorphismes du promoteur d'ABCA1 -395C et -564T,

en DL total au vue de la répartition des génotypes, sont associés à une augmentation du taux d'ApoE chez les femmes ($p \leq 0,02$). Le troisième polymorphisme du promoteur, *ABCA1* C-7T serait lui aussi associé au taux d'apoE ($p < 0,03$) chez la femme ainsi qu'aux triglycérides ($p < 0,04$) et à l'ApoC3 ($p < 0,01$) (Tableau XXVI). De plus, K1587 est associé chez les femmes à une variation des taux d'ApoE ($p < 0,005$) et d'ApoC3 ($p < 0,01$) mais dans le sens d'une diminution (Tableau XXVII).

Aucune association n'est significative chez les hommes. Nous observons seulement que les hommes porteurs de l'allèle sauvage K1587 semblent avoir des taux plus élevés d'ApoC3 que les autres (89,98 (86,48-93,62) versus (80,81 (77,6-84,16)), ($p = 0,04$); ces résultats allant dans le sens inverse de ceux observés chez les femmes.

Enfin, les polymorphismes *ABCG8* T54C, *ABCA1* I883M, *ABCA1* R219K, *ABCG8* A632V et *ABCG8* T400K ne sont associés à aucun paramètre biologique.

(c) Discussion

Dans la littérature, les polymorphismes d'*ABCA1* sont principalement associés à des modifications du cholestérol HDL et de l'ApoA1 tandis que ceux d'*ABCG8* sont associés à des variations des taux de cholestérol total, du LDL et d'ApoB. Or nous ne pouvons mettre en évidence ces associations dans notre échantillon. Un effectif peut-être trop faible ou un effet caché par la co-existence d'autres polymorphismes actifs pourraient expliquer pourquoi nous ne répliquons pas ces observations dans notre travail. Notre étude montre essentiellement une association significative entre certains polymorphismes et les taux d'ApoE et d'ApoC3 chez les femmes.

ABCA1 joue un rôle clé dans le transport inverse des HDL des cellules périphériques vers le foie. En effet, *ABCA1* assure le transport du cholestérol et des phospholipides de la cellule vers les apolipoprotéines (ApoA1) fixées à sa surface [25]. Certaines aberrations génétiques d'*ABCA1* entraînent des perturbations dans le métabolisme des lipoprotéines et contribuent ainsi à l'athérosclérose et à d'autres pathologies cardiovasculaires [27]. Des mutations d'*ABCA1* peuvent entraîner des syndromes de déficit sévère (voire d'absence) en HDL avec accumulation du cholestérol estérifié à l'intérieur des cellules : la maladie de Tangier ou analphalipoprotéïnémie, et la déficience familiale en HDL [25, 46].

Contrairement à nos résultats, la plupart des études sur les polymorphismes d'*ABCA1* ont montré des associations entre ses polymorphismes et les taux de HDL ou d'ApoA1. Ainsi, au moins 10% des individus présentant des faibles taux de HDL sont hétérozygotes pour une

mutation d'*ABCA1* [47]. Certains des polymorphismes de la région codante sont en fort DL et quelques uns des haplotypes obtenus ont été associés à des variations du HDL cholestérol plasmatique [47, 206]. 219K est plus fréquent chez les sujets avec des taux élevés de HDL que chez les sujets avec des taux faibles [207]. La présence de l'allèle K1587 paraît associée à des taux faibles de HDL tandis que 771M paraît associé à des taux plus élevés [46]. A noter, dans notre étude les porteurs d'au moins un allèle K1587 auraient également des taux de HDL plus faible puisqu'ils ont un taux d'HDL moyen de 1,63 (1,58-1,67) contre 1,73 (1,69-1,76) pour les non porteurs ($p=0,07$). V825I, I883M et E1172D pourraient également influencer les taux plasmatiques de HDL cholestérol [47]. Des polymorphismes d'*ABCA1* entraîneraient également des variations intéressantes de l'ApoA1 plasmatique [47]. Ainsi, les variants de C-564T et R1587K ont été associés au taux plasmatique d'ApoA1 (taux élevé et taux bas respectivement) [49].

Peu d'études se sont intéressées aux associations entre polymorphismes d'*ABCA1* et molécules pro-athérogéniques. D'après Frikke-Schmitz et al., les polymorphismes d'*ABCA1* ne semblent pas avoir d'effet sur le cholestérol total, les triglycérides et l'ApoB [47]. De même, Souverein et al., [208] ne montrent pas d'association significative entre *ABCA1* C-477T ou G1051A et le taux de triglycérides plasmatiques chez des hommes atteints de maladies des artères coronaires en association multivariée (bien qu'il y est une association significative en univariée). Cependant, certains auteurs sont en accord avec notre observation d'une association entre polymorphismes d'*ABCA1* et taux de molécules pro-athérogènes. Ainsi, nous observons des taux d'ApoC3 plus élevés chez les porteurs d'un allèle -7T ou 1587R. En accord avec ce résultat, Clee et ces collègues [209] montrent une augmentation des triglycérides plasmatiques chez les hétérozygotes pour des mutations d'*ABCA1*. Ceci pourrait être lié à une interaction entre polymorphismes d'*ABCA1* et polymorphismes d'*APOE* [210]. Il a été montré que les mutés pour l'haplotype *ABCA1*-3 (G1051A; R219K) ont des taux plus significativement élevé de LDL [211]. De même, dans une population de 2700 suédois il apparaît que R219K pourrait influencer les taux d'ApoB et de LDL plasmatiques chez les fumeurs exclusivement [212] (taux d'ApoB, LDL et cholestérol total plus faibles chez les porteurs R219). Nous observons également une association entre ce polymorphisme et le LDL mais non significative et qui tend plutôt à associer l'allèle R219 a un taux plus élevé de LDL. Nous montrons dans ce travail que 3 polymorphismes d'*ABCA1* sont associés au taux d'ApoE plasmatique chez les femmes. Aucune étude n'avait encore montré une telle association. En plus du cholestérol, *ABCA1* modulerait la sécrétion de l'ApoE par les macrophages [213]. *ABCA1* faciliterait également l'efflux du cholestérol vers l'ApoE et il a été montré in vitro chez la souris que des déficiences en transporteur *ABCA1* sont associés à une diminution du taux d'ApoE au niveau cérébral et plasmatique [214, 215]. Cependant, Wahrle et al., [216] ne

mettent pas en évidence d'association entre 10 polymorphismes d'*ABCA1* et le taux d'ApoE dans le liquide cébrospinal de 168 sujets humains.

Les transporteurs *ABCG5* et *G8* évitent l'accumulation des phytostérols dans l'organisme en les rejetant de l'entérocyte vers la lumière intestinale et de l'hépatocyte vers la bile. De nombreuses mutations dans les gènes codants ces deux protéines peuvent entraîner l'apparition d'un trouble métabolique rare : la bétasitostérolémie [18]. Cette pathologie est caractérisée par un taux élevé d'absorption de tous les types de stérols (cholestérol, phytostérols, et stérols des fruits de mer) et une diminution de leur sécrétion dans la bile ce qui entraîne notamment le développement d'une athérosclérose prématurée. Des variations modérées de certains phytostérols, fréquemment observées dans la population générale, ont elles aussi été associées à une augmentation du risque cardiovasculaire (exemple : sitostérol et maladies coronariennes [217]).

Certains polymorphismes relativement fréquents d'*ABCG5* et d'*ABCG8* ont été associés à des variations des taux plasmatiques de lipides pro-athérogéniques (phytostérols et/ou de cholestérol) [56, 57, 218]. Ils influenceraient également, de façon sexe dépendante, la réponse à un changement de régime diététique [57, 219], ou la réponse à un traitement hypolipémiant [92]. Il semble probable qu'il y est une forte interaction avec l'alimentation et le sexe [57]. En effet, certaines études n'ont pas montré d'association entre polymorphismes d'*ABCG8* et lipides dans leur population globale mais ont mis en évidence des associations en séparant les individus en fonction du sexe et/ou de leurs apports alimentaires en lipides. Par exemple, *ABCG8* TYR54CYS et THR400LYS ont été associés avec les taux de cholestérol total et de LDL chez les hommes sous régime alimentaire, mais pas chez les femmes [57]. De plus, il a été montré chez des enfants que la présence d'*ABCG8* ALA632VAL est associée avec une variation des taux de cholestérol total, de LDL et d'ApoB mais chez les enfants consommant peu de cholestérol exclusivement [205]. Bien que nous ayons séparé notre population en fonction du sexe, nous ne mettons en évidence aucune association entre les 3 polymorphismes d'*ABCG8* étudiés et les taux de lipides plasmatiques. Peut être aurait-il été nécessaire d'intégrer des données de régimes alimentaires, que nous n'avons pas, pour mettre en évidence les associations décrites dans la littérature.

Afin d'évaluer par la suite l'importance d'*ABCB1* comme nouveau marqueur génétique du risque cardiovasculaire, nous avons évalué dans notre échantillon les associations entre les taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques et les variants génétiques de 2 autres transporteurs ABC connus pour leur implication dans le métabolisme des lipides.

→ Contrairement à certains auteurs, nous ne mettons en évidence ni association entre génotypes d'*ABCA1* et taux d'HDL ou d'ApoA1 ni association entre polymorphismes d'*ABCG8* et taux de cholestérol ou de LDL. Parmi les explications possibles, citons un effectif peut-être trop faible ou un effet caché par la co-existence d'autres polymorphismes actifs.

→ Cependant, nous montrons l'existence d'associations significatives entre 4 polymorphismes d'*ABCA1* et les taux d'Apolipoprotéine E et/ou C3, chez les femmes exclusivement. Ces associations avec les concentrations en molécules pro-athérogènes sont contradictoires et peu étudiées dans la littérature et mériteraient une étude plus approfondie en tenant compte notamment d'interactions gène-gène potentielles entre *ABCA1* et *APOE*.

E. Part des polymorphismes d'*ABCB1* dans la variabilité des lipides et des apolipoprotéines : corrélations familiales

En plus des facteurs constitutionnels (sexe et âge), les facteurs de variation des taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines sont à la fois génétiques et environnementaux. Nous avons montré dans les chapitres précédents qu'il existe certaines associations significatives entre polymorphismes des gènes codant les transporteurs ABC et les taux plasmatiques de certains lipides ou apolipoprotéines. L'objectif de l'analyse qui suit était donc d'évaluer la part des polymorphismes d'*ABCB1*, mais également d'*ABCA1* et d'*ABCG8*, dans la modulation des taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines chez des sujets sains. Nous voulions déterminer dans notre échantillon qu'elle est la part des polymorphismes d'*ABCB1* dans la variabilité globale (génétique + environnementale) du taux de lipides et d'apolipoprotéines dans la population étudiée. De plus, nous souhaitons comparer la part des polymorphismes d'*ABCB1* et celle des polymorphismes d'*ABCA1* et d'*ABCG8* dans cette variabilité génétique.

Disposer d'une population familiale, nous permet de pouvoir déterminer les parts respectives de la génétique et de l'environnement dans la variabilité des taux plasmatiques de lipides et de lipoprotéines. Cela permet aussi de déterminer la part d'un polymorphisme donné dans cette génétique à condition d'observer une association significative entre ce polymorphisme et le paramètre biologique quelque soit le sous-groupe étudié (parents/enfants, hommes/femmes). Cependant, les résultats obtenus et présentés ci-dessus en C et D nous limitent dans cet objectif. En effet, le polymorphisme C3435T est le seul pour lequel nous observons une association à la fois chez les hommes et chez les femmes avec le taux d'ApoA1, et aucun des polymorphismes d'*ABCA1* ou *G8* n'est associé à l'ApoA1. Enfin, toutes les associations observées avec ces polymorphismes sont limitées au sous-groupe femmes. Nous nous sommes donc exclusivement intéressés à déterminer la part du polymorphisme C3435T d'*ABCB1* dans la variabilité du taux d'ApoA1 plasmatique.

1) Part d'*ABCB1* C3435T dans la variabilité de l'ApoA1 dans l'échantillon étudié

Afin d'évaluer s'il y a une association entre génétique et taux d'ApoA1 plasmatique, et si celle-ci est liée, au moins en partie, au polymorphisme *ABCB1* C3435T, nous avons testé 3 modèles différents de corrélations intrafamiliales (Tableau XXVIII). Tous les modèles utilisent des valeurs ajustées sur l'âge, l'alcool, le tabac, l'IMC, les contraceptifs et la prise d'oestrogènes pour les femmes.

Le modèle 1 estime 8 corrélations avec comme hypothèse qu'il existe un effet du sexe sur les corrélations chez les parents ou chez les enfants. Les modèles 2 et 3 n'estiment que 3 corrélations avec comme hypothèse qu'il n'y a pas d'effet du sexe sur les corrélations chez les parents ou chez les enfants. Dans le modèle 3, est inclus en plus la génétique, plus précisément le polymorphisme C3435T.

Il apparaît que le modèle 2 est aussi informatif que le modèle 1, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence d'effet du sexe sur les corrélations entre parents et enfants et enfants-enfants. Nous garderons donc le modèle 2 par rapport au 1. Il y a une tête de corrélation génétique c'est-à-dire qu'il n'y a pas de corrélation significative entre les parents (sujets non apparentés génétiquement) ($r_{PM} = -0,055$, NS) tandis qu'il existe une corrélation significative ou limite significative entre sujets génétiquement apparentés, c'est-à-dire parents et enfants et enfants-enfants (parents-enfants $r_{o} = [0,172]$ $p < 0,01$) et enfants-enfants $r_{o} = [0,211]$, $p < 0,10$).

Cependant, bien qu'il semble y avoir une tendance ($p = 0,10$), le modèle dans lequel on inclut le polymorphisme C3435T (modèle 3) n'est pas significativement différent du modèle 2 ($\chi^2 = 4,52$ à 4 ddl) donc ne permet pas de montrer que le polymorphisme C3435T participe à ces corrélations.

Tableau XXVIII : Estimation des corrélations familiales (coefficients de corrélation±écart-type) pour les taux d'ApoA1 dans l'échantillon de la cohorte STANISLAS étudié.

	Modèle 1 à 8 corrélations	Modèle 2 à 3 corrélations	Modèle 3 à 3 corrélations + génétique
PM (n=86)	-0,055±0,11	-0,055±0,11	-0,0535±0,12
PG (n=58)	0,20±0,11 (p<0,10)	0,17±0,06 **	0,15±0,06 *
PF (n=51)	0,28±0,14 *	[0,17]	[0,15]
MG (n=58)	0,10±0,14	[0,17]	[0,15]
MF (n=51)	0,14±0,12	[0,17]	[0,15]
GG (n=19)	0,74±0,12 ***	0,21±0,12 (p<0,10)	0,21±0,12 (p<0,10)
GF (n=21)	0,185±0,14	[0,21]	[0,21]
FF (n=13)	0,058±0,25	[0,21]	[0,21]
-Log L	-96,8	-93,5	-97,3
Modèle alternatif	-	Modèle 1	Modèle 2
χ^2 (ddl)	-	6,54 (5)	7,52 (4)
p	-	NS	NS (0.10)

PM : Paire Père-Mère, PG : Père-Garçon, PF Père-Fille, MG : Mère-Garçon, MF : Mère-Fille, GG : Garçon-Garçon, GF : Garçon-Fille, FF : Fille-Fille.

Les valeurs entre crochets sont forcées à être égales à la valeur précédente en fonction de l'hypothèse du modèle.

-Log L : *-Logarithm of likelihood function* = Maximum de vraisemblance

NS non significatif ; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

A noter, si l'on considère le HDL, il existe également une tête de corrélation génétique avec une absence de corrélation chez les parents ($r_o=0,025\pm0,110$; NS), tandis qu'il existe une corrélation significative entre parents et enfants ($r_o=0,194\pm0,0655$; p<0,01) et entre enfants et enfants ($r_o=0,358\pm0,1055$; <p<0,001) (Tableau XXIX). Cependant, le modèle dans lequel on inclut C3435T (modèle 3) n'est pas significativement différent du modèle ne l'incluant pas ($\chi^2=2,1$ à 4 ddl) donc ne permet pas de montrer que C3435T participe à ces corrélations.

Tableau XXIX : Estimation des corrélations familiales pour les taux de HDL dans l'échantillon de la cohorte STANISLAS étudié.

	Modèle à 3 corrélations	Modèle alternatif à 3 corrélations+génétique
PM (n=86)	0,025±0,110	0,0155±0,113
PG (n=58)	0,194±0,0655 **	0,187±0,0675 **
PF (n=51)	[0,194]	[0,187]
MG (n=58)	[0,194]	[0,187]
MF (n=51)	[0,194]	[0,187]
GG (n=19)	0,358±0,1055 ***	0,390±0,106 ***
GF (n=21)	[0,358]	[0,390]
FF (n=13)	[0,358]	[0,390]
- Log L	63,95	62,86
χ^2 (ddl)		2,1 (4)
p		NS

2) Discussion

Parmi les facteurs de variation du taux d'ApoA1 plasmatique pouvant être considérés comme environnementaux se trouvent le statut hormonal, les concentrations en autres lipides ou encore l'IMC et l'alcool [7, 220-222]. Par exemple, Bigazzi et al., [222] ont montré que le taux d'ApoA1 est influencé notablement par l'utilisation d'oestrogènes, par le cholestérol total et par l'ApoE et dans une moindre mesure, par les taux de triglycérides et d'ApoB, par l'IMC, l'âge et la consommation d'alcool. L'ensemble de ces facteurs expliquant approximativement 24% de la variabilité de l'ApoA1 [222]. Ceci justifie l'ajustement que nous avons réalisé sur ces facteurs. Parmi les facteurs de variation génétiques connus figurent *ABCA1*, les clusters *APOA1/C3/A4/A5* et *APOE/C1/C2/C4*, *CETP* ou encore *CYP7A1* [7, 49, 223].

La variance phénotypique peut-être décomposée en une composante environnementale famille-indépendante et une composante génétique liée à la famille. L'héritabilité estimée/calculée (h^2) peut être définie comme le ratio des variances génétiques sur la variance phénotypique totale [221]. Des études sur des populations de jumeaux ont permis d'évaluer l'héritabilité estimée de l'ApoA1. (A noter, les études sur jumeaux surestime toujours cette héritabilité car très proches génétiquement et comportementalement). Celle-ci varie de 0,36 à 0,78 selon l'étude [220, 221]. Cette variabilité s'expliquerait en grande partie par les différences d'âge des populations étudiées et semble plus faible pour l'ApoA1 que pour d'autres lipides/lipoprotéines [220]. A notre connaissance, une seule étude à été menée sur des familles pour déterminer l'héritabilité de l'ApoA1 [224]. Ces auteurs ont ainsi montré dans une population de 99 familles caucasiennes une héritabilité estimée de l'ApoA1 de $0,57 \pm 0,07$. Nous ne pouvons dans ce travail calculer l'héritabilité estimée car notre échantillon est trop faible.

Nous confirmons dans cette étude, l'existence d'une modulation du taux d'ApoA1 par la génétique. Cependant, nous ne mettons pas en évidence d'implication du polymorphisme *ABCB1* C3435T dans cette variabilité liée à la génétique. Ceci peut s'expliquer notamment par le faible nombre de couples parents/enfants. Nous avons en effet travaillé sur un total de 86 hommes, 86 femmes, 58 garçons et 52 filles soit 86 couples P/M, 58 couples P/G, 58 couples M/G, 51 couples P/F, 51 couples M/F, 21 couples G/F, 19 couples G/G, 13 couples F/F (soit 53 couples enfants/enfants).

En conclusion, nous souhaitons évaluer dans notre population la part des polymorphismes d'*ABCB1*, mais également d'*ABCA1* et d'*ABCG8*, dans la modulation des taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines chez des sujets sains.

Cependant, le polymorphisme C3435T d'*ABCB1* est le seul pour lequel nous observons une association à la fois chez les hommes et chez les femmes avec le taux d'ApoA1. De plus, aucun des polymorphismes d'*ABCA1* ou *G8* n'est associé à l'ApoA1. Enfin, toutes les associations observées avec ces polymorphismes sont limitées au sous-groupe femmes. Nous nous sommes donc exclusivement intéressés à déterminer la part du polymorphisme C3435T d'*ABCB1* dans la variabilité du taux d'ApoA1 plasmatique.

→ Bien qu'une part de la variabilité du taux d'ApoA1 soit liée à la génétique, le polymorphisme C3435T d'*ABCB1* n'explique aucune part de cette variabilité génétique du taux d'ApoA1 dans notre échantillon familial. Ceci pourrait être dû à un manque de puissance liée à un manque de familles parents-enfants complètes.

II. Analyse génomique du transporteur ABCB1 et lipides chez les sujets de l'étude HYDROGENE

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Centre d'Investigation Clinique du CHU de Nancy, dirigé par le Pr Zannad, qui a été à l'origine avec le Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre-lès-Nancy du recrutement des sujets inclus dans l'étude HYDROGENE.

Nous avons montré dans un échantillon de sujets sains de la cohorte STANISLAS l'existence d'associations significatives entre polymorphismes d'*ABCB1* et variabilité des taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines. Les témoins inclus dans l'étude HYDROGENE sont des sujets supposés sains, comme dans la cohorte STANISLAS, mais dont la moyenne d'âge est plus élevée donc à priori avec un risque plus élevé de développer des maladies cardiovasculaires. De plus, plus les sujets sont âgés, plus on suppose que l'environnement joue un rôle important dans la variabilité de phénotypes d'intérêt tels que les taux de lipides plasmatiques. Les cas inclus dans l'étude HYDROGENE sont des hypertendus-diabétiques, et forment ainsi une population à haut risque cardiovasculaire.

Notre troisième objectif était donc d'évaluer si les polymorphismes d'*ABCB1* influenceraient également les taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines chez des sujets à risque cardiovasculaire élevé.

Dans une première étape, nous nous sommes attachés à établir les fréquences génotypiques des polymorphismes d'*ABCB1* dans les groupes cas et témoins de l'étude HYDROGENE. Puis nous avons mené des études d'associations entre génotypes d'*ABCB1* et concentrations en lipides et lipoprotéines du plasma. Enfin, nous avons discuté les effets observés dans chacun des 3 groupes : hypertendus-diabétiques et sujets sains de l'étude HYDROGENE et sujets sains de la cohorte STANISLAS.

A. Caractéristiques de la population HYDROGENE

La population de l'étude HYDROGENE est composée de 64 patients hypertendus et diabétiques et de 92 témoins. Leurs caractéristiques cliniques et biologiques et leur consommation médicamenteuse sont présentées dans le Tableau XXX. Brièvement, nous observons qu'il y a significativement plus d'hommes chez les cas, qu'ils présentent un IMC et des taux de triglycérides et d'ApoB, plus élevés tandis que leurs valeurs plasmatiques d'HDL et d'ApoA1 sont plus faibles. Le Tableau XXXI présente la répartition des caractéristiques dans chaque groupe en fonction du sexe.

Tableau XXX : Caractéristiques des groupes cas et témoins de l'étude HYDROGENE.

Caractéristiques	Cas (n=64)	Témoins (n=92)	P (χ^2 ou Mann-Whitney)
Hommes (%)	65,6	48,9	0,04
Age (années)	55,7±8,7	55,3±6,0	NS
IMC (kg/m ²) ^a	30,2 (26,3-34,7)	23,4 (20,9-26,3)	0,008
Fumeurs actifs (%)	21,9	18,5	NS
CO/THS (% chez femmes)	18,2	59,6	0,001
Antihypertenseurs (%)	50,0	0	<0,005
Hypoglycémiants (%)	73,4	0	<0,005
Hypolipidémiants (%)	39,1	1,1	<0,005
Statines (%)	15,6	1,1	<0,005
PAS moyenne (mmHg) ^a	151 (135-170)	123 (115-132)	<0,005
PAD moyenne (mmHg)	87±10	74±7	0,006
HbA1c (%) ^a	6,61 (5,75-7,59)	5,13 (4,68-5,62)	0,007
Cholestérol total (mmol/L)	5,21±0,71	5,36±0,67	NS
Triglycérides (mmol/L) ^a	1,48 (0,93-2,34)	0,98 (0,65-1,48)	<0,005
LDL cholestérol (mmol/L)	3,20±0,57	3,18±0,60	NS
HDL cholestérol (mmol/L)	1,20±0,35	1,65±0,45	<0,005
ApoB (g/L) ^b	1,04±0,19	0,99±0,17	0,04
ApoA1 (g/L) ^b	1,47±0,25	1,69±0,29	<0,005
ApoE ^{a,b}	38,0 (28,8-50,1)	40,7 (30,9-53,7)	NS

^a Distribution non normale.

^b ApoA1, B and E : une valeur manquante (un cas femme).

Tableau XXXI : Caractéristiques des groupes cas et témoins de l'étude HYDROGENE en fonction du sexe.

Caractéristiques	Cas (n=64)		Témoins (n=92)	
	Hommes (n=42)	Femmes (n=22)	Hommes (n=45)	Femmes (n=47)
Age (années)	55,9±9,0	55,5±8,2	56,0±5,6	54,5±6,4
Non fumeurs (%)	45,2	86,4	44,4	70,2
Ex fumeurs (%)	26,2	4,55	37,8	10,6
Fumeurs actifs (%)	28,6	9,1	17,8	19,15
CO/THS (% chez femmes)	-	18,2	-	59,6
Antihypertenseurs (%)	47,6	54,55	0	0
Hypoglycémiantes (%)	78,6	63,6	0	0
Hypolipidémiantes (%)	40,5	36,4	1	0
Statines (%)	16,7	13,6	1	0
PAS moyenne (mmHg) ^a	151 (135-170)	158 (141-178)	129 (123-135)	120 (112-129)
PAD moyenne (mmHg)	86±10	87±10	78±6	70±6
HbA1c (%) ^a	6,61 (5,75-7,59)	6,76 (5,89-7,76)	5,13 (4,68-5,62)	5,01 (4,57-5,50)
IMC (kg/m ²) ^a	29,5 (25,1-34,7)	31,6 (28,8-34,7)	24,5 (22,4-26,9)	21,9 (19,5-24,5)
Cholestérol total (mmol/L)	4,96±0,69	5,71±0,47	5,25±0,58	5,47±0,74
LDL cholestérol (mmol/L)	3,05±0,59	3,49±0,41	3,19±0,50	3,16±0,69
HDL cholestérol (mmol/L)	1,15±0,30	1,29±0,42	1,45±0,40	1,84±0,42
Triglycérides (mmol/L) ^a	1,35 (0,83-2,19)	1,74 (1,20-2,51)	1,10 (0,69-1,74)	0,89 (0,65-1,23)
ApoA1 (g/L) ^b	1,41±0,23	1,59±0,25	1,59±0,22	1,79±0,32
ApoB (g/L) ^b	1,00±0,20	1,13±0,15	1,01±0,14	0,96±0,19
ApoE ^{a b}	36,3 (27,5-47,9)	41,7 (34,7-50,1)	40,7 (30,9-53,7)	39,8 (29,5-53,7)

^a Distribution non normale.

^b Pour l'ApoA1, B et E, il manque une valeur pour une femme cas.

B. Etude des fréquences des polymorphismes d'*ABCB1*

Comme l'effectif de l'étude HYDROGENE est plus faible que celui de l'échantillon de la cohorte STANISLAS précédemment étudié, nous avons choisi de nous limiter à l'étude des polymorphismes d'*ABCB1* dont la fréquence allélique est estimée supérieure à 40% dans la population caucasienne c'est à dire C1236T, T-76A, G2677T/A et C3435T. Pour les mêmes raisons, nous n'avons pas fait non plus d'étude haplotypique.

A l'exception de 3 témoins dont l'ADN semblait dégradé, les sujets inclus dans l'étude HYDROGENE, soit 64 patients et 89 témoins, ont été génotypé avec succès pour les 4

polymorphismes d'*ABCB1* considérés (Tableau XXXII). La distribution des polymorphismes respecte l'équilibre d'Hardy Weinberg (HW), excepté pour C1236T et T-76A chez les cas hommes.

Tableau XXXII : Génotypes des cas et des témoins de l'étude HYDROGENE pour les polymorphismes d'*ABCB1*.

	Hommes				Femmes				Total			
	11	12	22	HW	11	12	22	HW	11	12	22	HW
Cas (n=64)												
C1236T	8	28	6	0,03	6	12	4	0,64	14	40	10	0,04
T-76A	13	27	2	0,01	8	11	3	0,8	21	38	5	0,03
G2677T/A	10	20	12	0,77	6	13	3	0,34	16	33	15	0,8
C3435T	8	17	17	0,33	4	13	5	0,39	12	30	22	0,75
Témoins (n=89)												
C1236T	19	17	8	0,24	18	20	7	0,71	37	37	15	0,28
T-76A	13	21	10	0,785	10	26	9	0,29	23	47	19	0,58
G2677T/A	19	15	10	0,055	18	20	7	0,71	37	35	17	0,105
C3435T	11	22	11	1	10	22	13	0,9	21	44	24	0,92

Les fréquences alléliques des allèles mutés en position C1236T, T-76A, G2677T/A et C3435T sont respectivement de 0,47 ; 0,375 ; 0,49 et 0,58 chez les cas et de 0,38 ; 0,48 ; 0,39 et 0,52 chez les témoins. La distribution des allèles diffère significativement entre les 2 groupes cas et témoins pour C1236T ($p=0,01$) et G2677W ($p=0,03$) (Tableau XXXIII), la fréquence de l'allèle muté étant supérieure chez les cas. Lorsque nous comparons avec la cohorte STANISLAS, la répartition allélique n'est pas significativement différente avec le groupe cas bien que la fréquence allélique de 1236T semble également supérieure chez les cas ($p=0,06$).

Tableau XXXIII : Comparaison des effectifs des génotypes pour les polymorphismes d'*ABCB1* entre cas et témoins de l'étude HYDROGENE.

SNP	CAS			TEMOINS			p (χ^2)	
	Fréquences génotypiques			Fréquences génotypiques			3 groupes	11 vs (12+22)
	11	12	22	11	12	22		
C1236T	0,22 (14)	0,625 (40)	0,155 (10)	0,415 (37)	0,415 (37)	0,17 (15)	0,02	0,01
T-76A	0,33 (21)	0,60 (38)	0,08 (5)	0,26 (23)	0,53 (47)	0,21 (19)	0,07	0,35
G2677W	0,25 (16)	0,515 (33)	0,235 (15)	0,415 (37)	0,39 (35)	0,19 (17)	0,10	0,03
C3435T	0,19 (12)	0,47 (30)	0,34 (22)	0,235 (21)	0,495 (44)	0,27 (24)	0,57	0,47

C. Associations des polymorphismes d'*ABCB1* aux taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques

L'effectif étant plus faible dans l'étude HYDROGENE que dans la cohorte STANISLAS, le seuil de significativité a été ramené à 0,04.

1) Groupe cas

Chez les cas, l'association la plus significative concerne C1236T et l'ApoE. En effet, les cas homozygotes TT ont des taux plus élevés d'ApoE même après ajustement significatif sur le tabac (ApoE : $prec=0,004$, tabac : $prec=0,02$). Cette association est retrouvée dans le sous-groupe hommes ($prec=0,025$).

De plus, le variant en position C3435T est associé à des taux plus faibles de HDL dans la population totale ($prec=0,015$) mais l'association n'est pas significative avec l'ApoA1 ($prec=0,07$) même s'il existe une tendance chez les femmes ($prec=0,049$).

Enfin, les homozygotes mutés en position -76 ont des taux plus faibles d'ApoB ($prec=0,022$) mais l'effectif de ces sujets doubles mutés est faible ($n=5$).

2) Groupe témoins

L'association la plus significative observée chez les témoins est l'association entre le polymorphisme C1236T et les taux de triglycérides plasmatiques (Tableau XXXIV). En effet, même après ajustement sur un autre facteur très significativement associé aux triglycérides, le IMC, les homozygotes mutés 1236T ont des taux significativement plus élevés de TG que les autres sujets ($prec=0,0004$) et cette association est également significative dans les 2 sous-groupes hommes et femmes. La même observation est faite pour les homozygotes mutés pour G2677W (population totale, $prec=0,016$ et sous-groupe femmes, $prec=0,02$).

Tableau XXXIV : Association entre les polymorphismes d'*ABCB1* et le taux de triglycérides plasmatiques (en mmol/L) chez les témoins de l'étude HYDROGENE (modèle récessif).

C1236T			G2677W						C3435T											
Population totale			Hommes		Femmes		Population totale			Femmes		Population totale		Femmes						
CC+CT (n=74)	TT (n=15)	Prec	CC+CT (n=36)	TT (n=8)	Prec	CC+CT (n=38)	TT (n=7)	Prec	GG+GW (n=72)	GW (n=17)	Prec	GG+GW (n=38)	WW (n=7)	Prec	CC+CT (n=65)	TT (n=24)	Prec	CC+CT (n=32)	TT (n=13)	Prec
0,965 (0,02)	1,135 (0,045)	0,0004	1,00 (0,03)	1,225 (0,075)	0,006	0,93 (0,02)	1,07 (0,05)	0,0096	0,97 (0,02)	1,08 (0,08)	0,016	0,93 (0,02)	1,06 (0,05)	0,02	0,97 (0,02)	1,04 (0,03)	0,09	0,93 (0,02)	10,01 (0,04)	0,06
BMI 0,0002			BMI 0,0013			BMI 0,0007						BMI 0,006								

De plus, si nous considérons un modèle dominant, les 4 polymorphismes sont associés à des taux différents de cholestérol total, LDL ou ApoB (Tableau XXXV) y compris après ajustement sur l'âge ou le sexe, lorsque ceux-ci sont significativement associés aux taux de cholestérol, de LDL et d'ApoB. Ainsi, la présence de l'allèle muté -76A chez les témoins est associée dans un modèle dominant à une diminution du taux de cholestérol total (pdom=0,017) et à des taux de LDL plus faibles (pdom=0,021). A l'inverse de T-76A, les témoins porteurs d'au moins un allèle muté en position 1236, ont des taux plus élevés de cholestérol total ainsi que d'ApoB (pdom=0,0265 et 0,049 respectivement). Ces deux associations sont significatives si l'on considère le sous-groupe hommes exclusivement (pdom=0,015 et 0,012 respectivement). Enfin, les porteurs d'au moins un allèle 3435T ont des taux d'ApoB plus élevés (pdom=0,015), ce que l'on observe également dans le sous groupe femmes (pdom=0,015).

Tableau XXXV : Association entre les polymorphismes d'*ABCB1* et les taux de cholestérol, LDL et ApoB chez les témoins de l'étude HYDROGENE (modèle dominant).

	T-76A			C1236T			G2677W			C3435T					
	Population totale			Population totale			Hommes			Population totale			Femmes		
	TT (n=23)	TA+AA (n=66)	Pdom	CC (n=37)	CT+TT (n=52)	Pdom	GG (n=19)	GW+WW (n=25)	Pdom	CC (n=21)	CT+TT (n=68)	Pdom	CC (n=10)	CT+TT (n=35)	Pdom
Chol. T	5,66 (0,13)	5,30 (0,08)	0,017	5,18 (0,11)	5,50 (0,09)	0,0265	5,02 (0,13)	5,44 (0,11)	0,0155	5,11 (0,15)	5,45 (0,08)	0,056			
	Age 0,032			Age 0,033						Age 0,018					
	Sexe 0,004														
	Age*sexe 0,002														
LDLc	3,36 (0,12)	3,11 (0,07)	0,09	3,05 (0,10)	3,27 (0,08)	0,099	3,02 (0,11)	3,32 (0,10)	0,051	2,96 (0,13)	3,24 (0,07)	0,07	2,75 (0,22)	3,28 (0,11)	0,0425
				Age 0,019						Age 0,009			Age 0,0013		
ApoB	1,055 (0,03)	0,96 (0,02)	0,021	0,94 (0,03)	1,02 (0,02)	0,049	0,95 (0,03)	1,06 (0,03)	0,012	0,91 (0,04)	1,01 (0,02)	0,015	0,82 (0,06)	1,00 (0,03)	0,015
	Age 0,015			Age 0,019						Age 0,006			Age 0,002		

3) Discussion

Le Tableau XXXVI synthétise les associations significatives observées entre les polymorphismes d'*ABCB1* et les paramètres biologiques étudiés dans les populations STANISLAS et HYDROGENE.

Les associations observées chez les sujets de l'étude HYDROGENE apparaissent cohérentes entre elles. En effet, les polymorphismes en DL positif (C1236T, G2677W et C3435T) font varier les paramètres dans le même sens (et dans le sens inverse de T-76A qui est en DL négatif avec eux). A noter, l'effet de chaque allèle muté est difficile à définir puisque dans certains cas les associations sont les plus significatives pour un modèle allélique et pour d'autres cas, avec un modèle dominant ou récessif.

Toutefois, nous ne retrouvons pas dans l'étude HYDROGENE l'ensemble des observations faites sur la cohorte STANISLAS. De plus, le sens de la modulation induite par la présence des polymorphismes est l'inverse de celui observé dans la cohorte STANISLAS, y compris chez les témoins dont le profil devrait ressembler à celui de l'échantillon de la cohorte STANISLAS. En effet, tandis que la présence des allèles mutés en position 3435, 2677 et 1236 et sauvage en -76 est associée à un profil anti-athérogène dans la cohorte STANISLAS, leur présence chez les cas et les témoins de l'étude HYDROGENE est plutôt associée à un profil pro-athérogène.

Ainsi, concernant C3435T, l'association majeure observée dans la cohorte STANISLAS avec l'ApoA1 n'est pas mise en évidence chez les témoins HYDROGENE. De plus, chez les cas, il existe une association significative entre ce polymorphisme et le HDL ($p=0,015$) mais qui va dans le sens inverse de celui observé dans la cohorte pour l'ApoA1. De plus, nous observons chez les témoins HYDROGENE une association significative entre le génotype 3435TT et un taux plus élevé d'ApoB ($p_{dom}=0,015$) qui n'était pas observé dans la cohorte STANISLAS.

Tout comme dans la cohorte STANISLAS, il semble possible de rapprocher l'effet des polymorphismes C1236T, G2677W et T-76A dans HYDROGENE. En effet, les allèles mutés pour ces polymorphismes sont associés avec une augmentation (pour 1236T et 2677W, diminution pour -76A) des taux de cholestérol, de LDL, d'ApoB et de triglycérides essentiellement chez les témoins. Ces associations étaient également présentes dans la cohorte STANISLAS mais allaient cependant dans un sens opposé. En effet, dans la cohorte

STANISLAS, la présence de 1236T et 2677W est plutôt associée à une diminution, et de – 76A à une augmentation, de ces paramètres pro-athérogènes.

L'une des explications possibles de ces différences pourrait être le manque de puissance de l'étude HYDROGENE, lié notamment au faible nombre de cas. Le nombre de sujets recrutés n'a en effet pas atteint l'objectif initial qui était de 200 cas et 200 témoins. De plus, il faut souligner un déséquilibre du ratio hommes-femmes chez les cas et l'existence de traitements multiples et hétérogènes. D'autre part, parmi les critères d'exclusion des témoins et des cas de l'étude HYDROGENE figure la dyslipidémie non traitée caractérisée par un LDL cholestérol > 4,20 mmol/L ou des triglycérides >3,40 mmol/L. Or, si l'on postule que certains génotypes d'ABCB1 sont associés à des taux plus élevés de ces paramètres, il est probable que ce critère d'exclusion entraîne un biais dans nos résultats, la fréquence de ces génotypes étant alors plus faible chez les sujets inclus dans HYDROGENE que ce que l'on pourrait attendre en réalité. Enfin, 40% des cas sont sous traitement hypolipémiants ce qui normalise leur valeur de cholestérol. A noter, 15% d'entre eux sont sous statines, or ces hypolipémiants peuvent être substrats et/ou inducteurs d'ABCB1.

Pour conclure, les associations observées dans l'étude HYDROGENE confirment l'existence d'associations entre polymorphismes d'*ABCB1* et taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques. Nous n'observons pas de différences entre les groupes témoins et hypertendus-diabétiques à l'exception d'une fréquence plus élevée des allèles mutés en position 1236 et 2677 chez les cas. Enfin, le sens inverse des associations observées dans la population HYDROGENE par rapport à la cohorte STANISLAS, et l'effet sexe-dépendant qui n'est pas retrouvé, restent à expliquer dans un échantillon plus important de sujets.

Tableau XXXVI : Synthèse des associations significatives entre présence d'un allèle muté et taux de lipides ou d'apolipoprotéines plasmatiques dans chacun des 3 groupes étudiés.

SNP	Param biol	STANISLAS (n=371)			CAS HYDROGENE (n=64)			TEMOINS HYDROGENE (n=89)		
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total
C3435T	ApoA1	↑ <i>pcod 0,05</i>	↑ pcod 0,009	↑ pcod 0,005		↓ <i>prec 0,049</i>	↓ <i>prec 0,074</i>			
	HDL						↓ prec 0,015			
	Chol							↑ <i>pdom 0,055</i>		↑ <i>pdom 0,056</i>
	LDL								↑ pdom 0,04	↑ <i>pdom 0,07</i>
	ApoB								↑ pdom 0,015	↑ pdom 0,015
	TG						↑ <i>prec 0,056</i>		↑ <i>prec 0,06</i>	↑ <i>prec 0,09</i>
	ApoE						↑ <i>prec 0,067</i>			
G2677W	HDL				↓ <i>prec 0,058</i>		↓ <i>prec 0,046</i>			
	Chol		↓ <i>pall 0,06</i>					↑ pdom 0,016		
	LDL		↓ <i>pall 0,05</i>					↑ <i>pdom 0,051</i>		
	ApoB		↓ <i>pall 0,04</i>					↑ pdom 0,012		
	TG								↑ prec 0,02	↑ prec 0,02
	ApoC		↓ <i>pall 0,05</i>							
	ApoE							↑ <i>prec 0,03</i>		↑ <i>prec 0,09</i>
C1236T	Chol		↓ pall 0,01					↑ <i>pdom 0,06</i>	↑ pdom 0,027	
	LDL		↓ <i>pall 0,03</i>						↑ <i>pdom 0,10</i>	
	ApoB		↓ pall 0,02						↑ <i>pdom 0,049</i>	
	TG							↑ prec 0,006	↑ prec 0,001	↑ prec 0,004
	ApoE				↑ <i>prec 0,025</i>		↑ prec 0,0004	↑ <i>prec 0,02</i>		
T-76A	Chol		↑ pall 0,004					↑ <i>pdom 0,08</i>	↓ pdom 0,017	
	LDL		↑ pall 0,02						↓ <i>pdom 0,09</i>	
	ApoB		↑ pall 0,002		↓ <i>prec 0,014</i>		↓ prec 0,022	↓ <i>pdom 0,057</i>	↓ pdom 0,021	
	TG		↑ <i>pall 0,05</i>			↓ <i>prec 0,032</i>			↓ <i>pdom 0,055</i>	
	ApoC		↑ <i>pall 0,04</i>							
	ApoA1								↓ <i>prec 0,038</i>	

En gras, p considéré comme significatif.

Les flèches indiquent le sens de la modification du taux plasmatique du paramètre biologique considéré induite par la présence de l'allèle muté.

L'étude des associations entre polymorphismes d'*ABCB1* et taux de lipides et de lipoprotéines plasmatiques chez les sujets de l'étude HYDROGENE, à risque cardiovasculaire plus élevé que les sujets de la cohorte STANISLAS, montre que :

→ la fréquence des allèles mutés en position 1236 et 2677 est plus élevée chez les cas que chez les témoins de l'étude HYDROGENE mais ne varie pas significativement de la répartition dans la cohorte STANISLAS (C1236T : $p=0,06$),

→ il existe des associations significatives entre polymorphismes et taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines chez les sujets de l'étude HYDROGENE. Notamment :

1) chez les cas, 1236T est associé avec une augmentation du taux d'ApoE et 3435T avec une diminution du taux de HDL,

2) chez les témoins, 1236T et 2677W sont associés à une augmentation du taux de TG. De plus 3435T et -76A sont associés respectivement à une augmentation du taux d'ApoB et à une diminution des taux de cholestérol et d'ApoB,

→ Ces associations diffèrent de celles observées dans la cohorte STANISLAS et tendent même à aller dans un sens opposé. En effet, lorsque la présence d'un allèle muté est associée à un phénotype pro-athérogène dans la cohorte STANISLAS, on observe une tendance inverse dans la population HYDROGENE chez les cas comme chez les témoins. De plus, l'effet sexe-dépendant n'est pas retrouvé chez les sujets de l'étude HYDROGENE.

→ Plusieurs points peuvent éclaircir ces disparités :

1) traitement par hypolipémiants d'un certain nombre de cas et co-existence de nombreux autres traitements médicamenteux,

2) faible effectif de l'échantillon et déséquilibre du ratio hommes/femmes chez les cas,

3) biais lié à l'exclusion de l'étude HYDROGENE des cas et des témoins ayant une dyslipidémie non traitée (LDL cholestérol > 4,20 mmol/L ou triglycérides > 3,40 mmol/L). En effet, l'exclusion des individus avec des valeurs hautes pourrait avoir décapité la présence de certains génotypes d'*ABCB1* et diminué leur fréquence.

III. Analyse transcriptomique de transporteurs, d'enzymes du métabolisme des médicaments et de facteurs de transcription dans les PBMCs de sujets de la cohorte STANISLAS

L'objectif global de ce travail d'analyse transcriptomique est d'évaluer si nous pouvons proposer de nouveaux biomarqueurs du risque cardiovasculaire facilement mesurables à grande échelle dans les PBMCs notamment l'expression de l'ARNm du transporteur ABCB1.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à évaluer par puces d'expression si les PBMCs seraient un tissu d'intérêt pour étudier l'expression d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de facteurs de transcription d'intérêt en physiopathologie cardiovasculaire. L'utilisation de puces permet de réaliser un screening rapide avant d'approfondir la démarche par RT-PCR. A noter, ABCB1 n'est pas étudié avec cette puce, seul PXR l'est.

Dans un deuxième temps, nous avons quantifié par RT-PCR en temps réel l'expression du transporteur ABCB1 et du facteur de transcription PXR dans les PBMCs de sujets sains de la cohorte STANISLAS. Nous avons évalué leurs facteurs de variation interindividuelle potentiels y compris les polymorphismes d'*ABCB1*. Enfin, nous avons testé chez les mêmes individus les associations entre l'expression d'*ABCB1* et de PXR dans les PBMCs et les taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques.

A. Analyse de l'expression d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de facteurs de transcription par puce à ADN (ARTICLE N°3)

Nous souhaitons évaluer par un screening rapide avec des puces d'expression si les PBMCs pourraient être un modèle d'étude de marqueurs du risque cardiovasculaire. Comme nous l'avons vu en introduction de nombreuses enzymes du métabolisme des xéno et endobiotiques et transporteurs (EMXT) sont impliqués dans la physiopathologie cardiovasculaire (métabolisme du cholestérol, des leucotriènes, de médicaments cardiovasculaires, ...). D'autre part, ces EMXT sont régulées par des facteurs de transcription tels que PXR. Nous avons donc étudié simultanément l'expression d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de facteurs de transcription (FT) dans les PBMCs de sujets de la cohorte STANISLAS grâce à une technique de puce d'expression.

1) Caractéristiques de l'échantillon étudié

22 individus ont été sélectionnés pour l'étude par puce d'expression sur les critères suivants :

- présence au 3^e point de recrutement de la cohorte STANISLAS (seul point pour lequel nous disposons d'une banque de lymphocytes permettant l'extraction d'ARN),
- absence de thérapeutiques cardiovasculaires,
- Absence de tabagisme actif ou de consommation élevée d'alcool (>32g/jour),
- bilans cliniques et biologiques complets.

Pour un sujet (puce n°10), la mesure d'expression n'a pas pu être faite suite à une erreur lors de l'étape d'hybridation sur la lame. Pour un autre sujet (puce n°18), les résultats obtenus semblaient faussés (profil atypique) et n'ont pas été pris en compte. L'effectif a donc été limité à 20 sujets. Les caractéristiques de ces 11 hommes et 9 femmes sont présentés dans le Tableau XXXVII.

Tableau XXXVII : Caractéristiques des 20 sujets ayant fait l'objet d'une étude par puce d'expression.

N° puce	sexe	age	IMC (kg/m ²)	GB (10 ⁹ /L)	cholestérol (mmol/L)	HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	GGT (UI/L)	GTP (UI/L)	CRP (mg/L)	Conso alcool
1	H	43	24,40	4,5	5,58	1,49	0,85	17	25	0,16	0
2	H	50	25,82	4,9	5,42	1,85	0,86	22	17	0,55	++
3	F	48	23,30	6,5	4,50	1,96	0,60	12	15	0,18	0
4	F	50	27,62	8,1	5,89	1,77	0,71	18	15	0,72	0
5	F ^a	51	31,66	5,5	5,70	1,14	1,03	25	54	8,53	0
6	M	52	34,83	5,9	6,50	1,70	2,06	58	29	3,13	+
7	M	52	32,23	4,5	5,54	1,13	2,00	41	64	1,98	+
8	F	48	31,05	7,0	5,16	1,17	1,93	nd	37	2,08	+
9	F	45	21,26	5,1	4,67	1,88	0,69	9	12	0,30	0
11	M	50	30,06	5,6	5,45	1,30	2,17	nd	54	2,03	+
12	M	55	37,91	6,5	4,78	1,52	0,68	44	42	6,09	0
13	F	46	26,70	6,5	4,82	2,12	0,86	14	16	1,40	0
14	M	46	25,24	5,2	5,30	1,97	0,58	17	18	0,64	+
15	M	52	30,23	5,6	5,13	1,35	1,67	19	23	0,59	+
16	M	51	23,25	5,6	5,86	1,98	0,70	17	23	0,70	+++
17	F ^a	50	23,05	6,0	4,93	1,43	0,54	27	18	1,01	+
19	F	49	37,73	8,3	6,10	1,22	2,89	36	31	4,86	+
20	M	52	32,20	5,6	7,10	1,53	1,43	30	28	0,67	++
21	F	50	30,10	5,8	6,30	2,09	0,86	29	46	5,08	0
22	M	55	29,14	5,4	5,68	1,62	1,44	99	60	0,51	0

^a : prise de contraceptifs oraux

Consommation d'alcool (+ 1, ++ 2, +++ 4 verres de vin par jour) ; nd : non disponible

2) Gènes exprimés sur les puces

Nous avons étudié l'expression dans les PBMCs de ces 20 sujets de 16 enzymes du métabolisme des médicaments et de 13 facteurs de transcription. Nous montrons ici, sans aucun mécanisme d'induction enzymatique, que les PBMCs expriment un grand nombre d'ARN messagers de CYPs, de GSTs et de facteurs de transcription. La majorité de ces gènes sont exprimés chez chaque individu. Ainsi, les CYP2C19, CYP2C9, CYP2J2, CYP2D6, CYP1A1, CYP4F2, CYP4A11 et CYP11B2 sont exprimés chez les 20 sujets étudiés. CYP2E1, CYP2C18 et CYP2A6 sont exprimés chez la majorité de ces sujets tandis que CYP3A4 et CYP3A5 ne sont pas détectés (Figure 38). Les GST sont exprimés mais la GSTM1 ne l'est que chez 4 sujets (Figure 38). Concernant les facteurs de transcription, PXR est celui exprimé chez le plus de sujets et dont l'expression semble la plus forte. MEF2A, VDR, LXR α , AHR, TCF7, CAR et ARNT sont exprimés chez la majorité des individus tandis que GR, PPAR γ et LXR β le sont seulement chez certains sujets. Enfin, PPAR α n'a été détecté que chez une personne et FXR n'a pas été détecté (Figure 39).

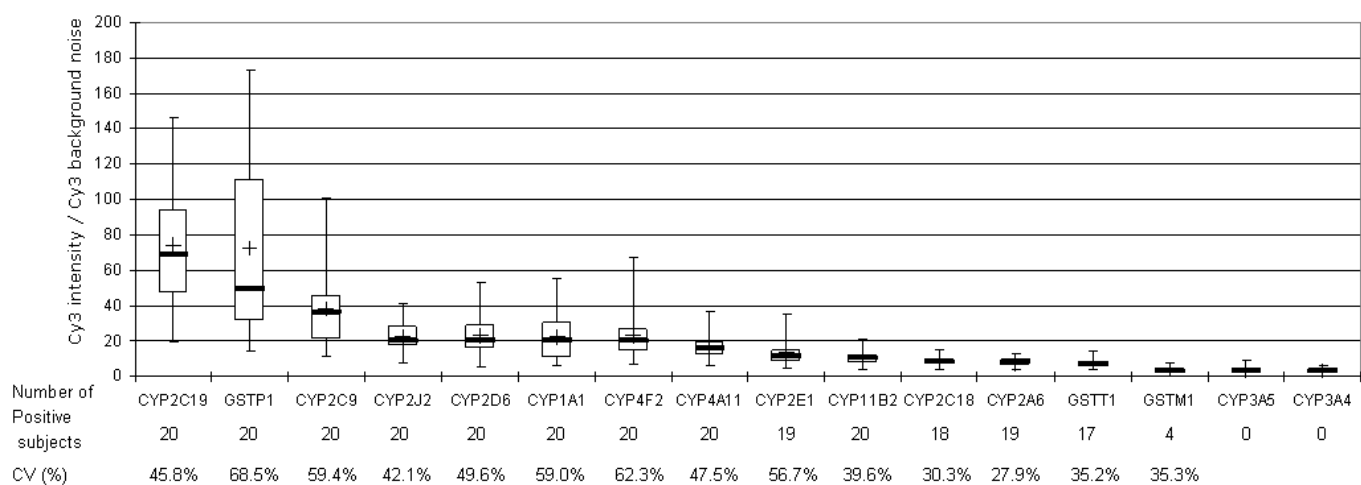


Figure 38 : Expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques chez 20 sujets de la cohorte STANISLAS.

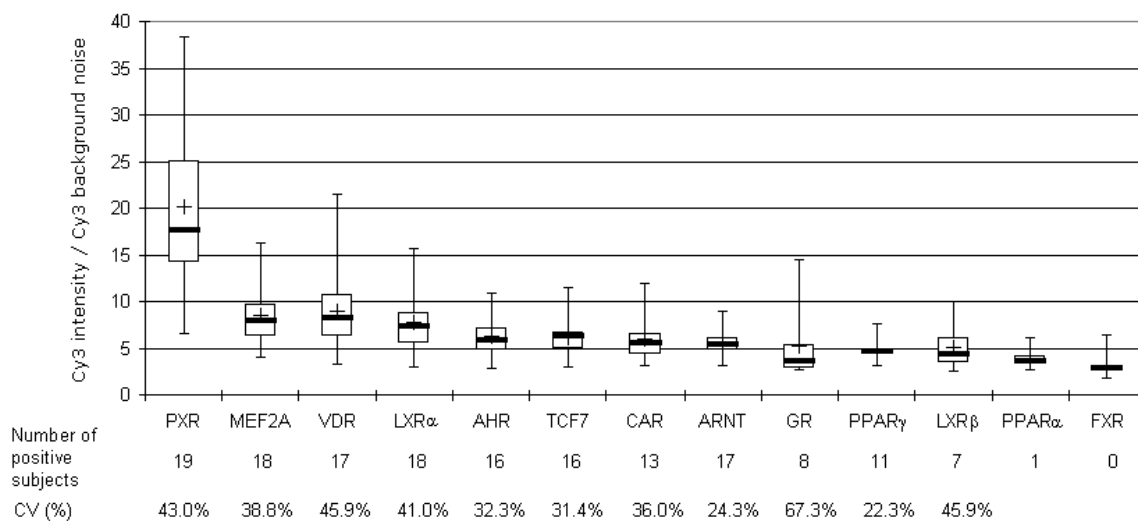


Figure 39 : Expression de facteurs de transcription chez 20 sujets de la cohorte STANISLAS.

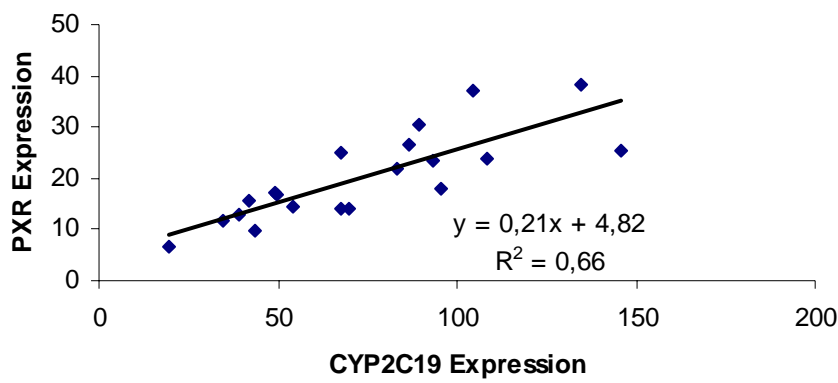
3) Corrélation observées entre EMX et facteurs de transcription

Nous avons observé dans les PBMCs étudiés un certain nombre de corrélations significatives entre EMX et facteurs de transcription.

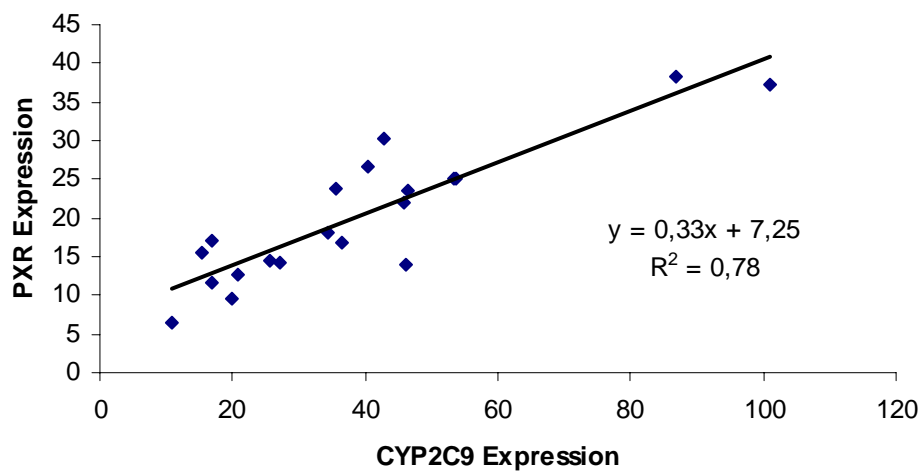
Ces associations concernent notamment les CYP450 liés à l'inflammation et à la régulation de la pression artérielle. Nous observons ainsi des associations significatives entre CYP2Cs (cytochromes du métabolisme des leucotriènes et de certains médicaments) et PXR ($p < 0,0001$, Figure 40). Ces associations sont connues pour d'autres tissus comme le foie [24]. Les CYP2Cs sont également corrélés avec LXR α ($p < 0,001$), LXR β (sauf CYP2C9, $p < 0,07$) et avec CAR ($p \leq 0,001$) mais pas avec GR. De plus, CYP4F2 (ou leucotriène β_4 ω hydroxylase), CYP4A11 (ou acide gras ω hydroxylase) et CYP2J2 (époxygénase active sur les eicosanoides) sont significativement corrélés avec PXR tout comme CYP11B2 (l'aldostérone synthase) ($p < 0,0005$) (Figure 41).

Comme cela a déjà été rapporté dans les PBMCs [24, 159, 166, 167, 171], nous observons également que CYP1A1 est corrélé significativement avec AhR ($p < 0,022$) et ARNT ($p < 0,006$), ces 2 facteurs de transcription étant également corrélés entre eux ($p < 0,0001$) (Figure 42).

A)



B)



C)

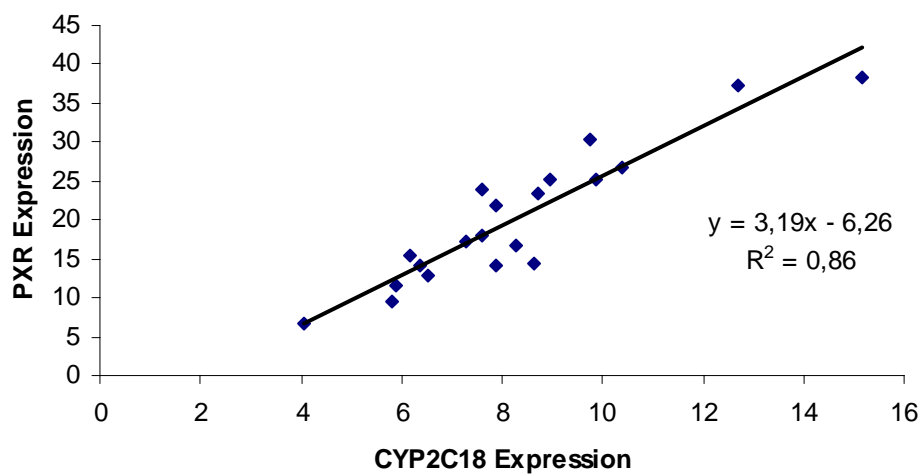
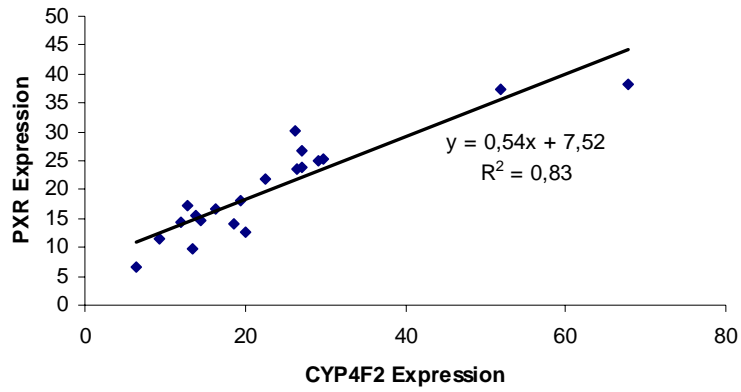
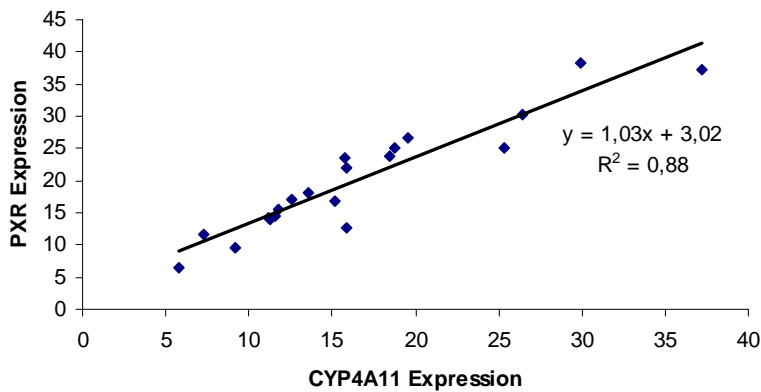


Figure 40 : Corrélation entre l'expression de PXR et des CYP2Cs dans les PBMCs des 20 sujets étudiés (expression = intensité de Cy3 / bruit de fond de Cy3).

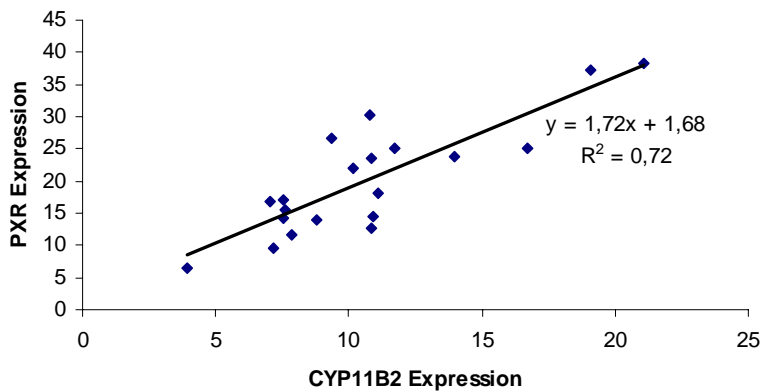
A)



B)



C)



D)

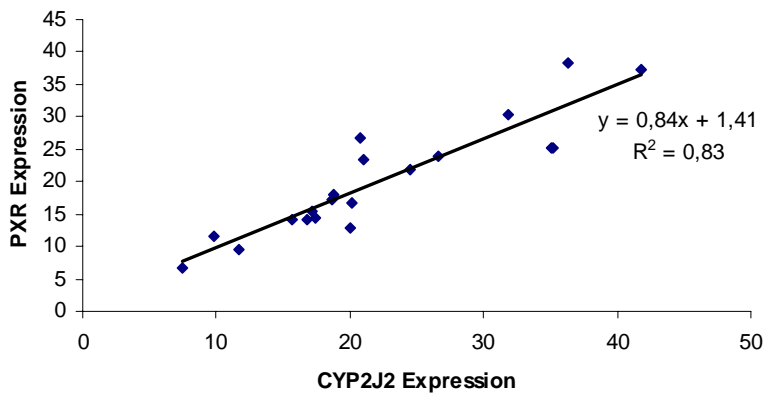
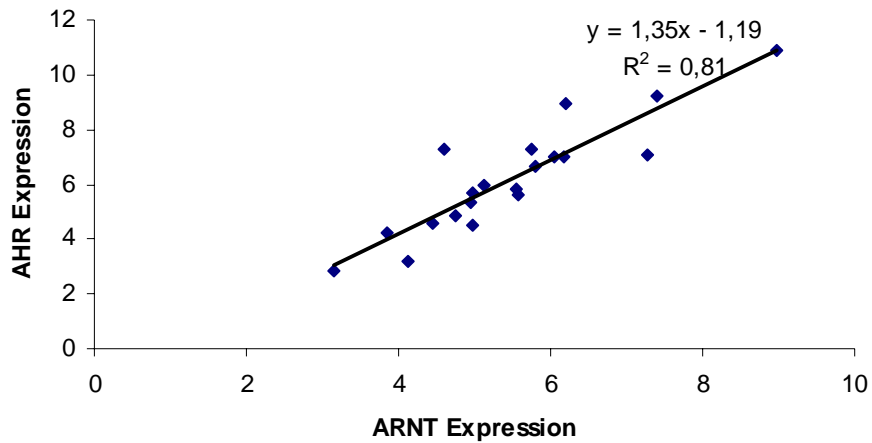
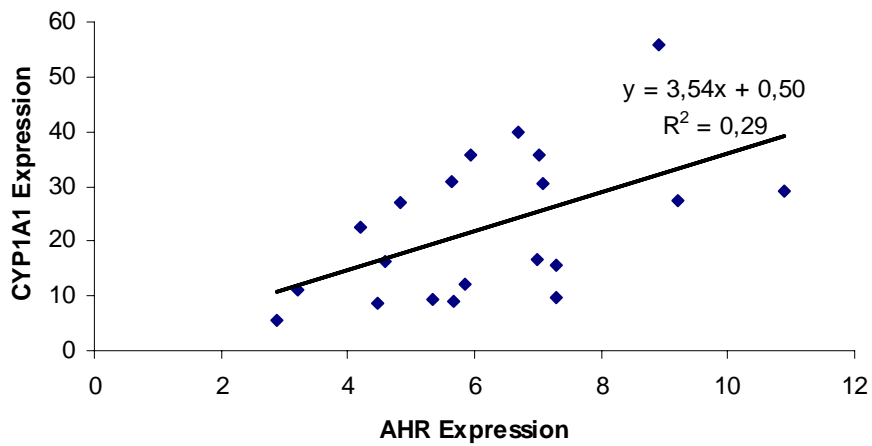


Figure 41 : Corrélation entre l'expression de PXR et des CYPs impliqués dans la régulation de la pression artérielle via différents métabolites actifs (eicosanoïdes, acides gras et stéroïdes) dans les PBMCs des 20 sujets étudiés (expression = intensité de Cy3 / bruit de fond de Cy3).

A)



B)



C)

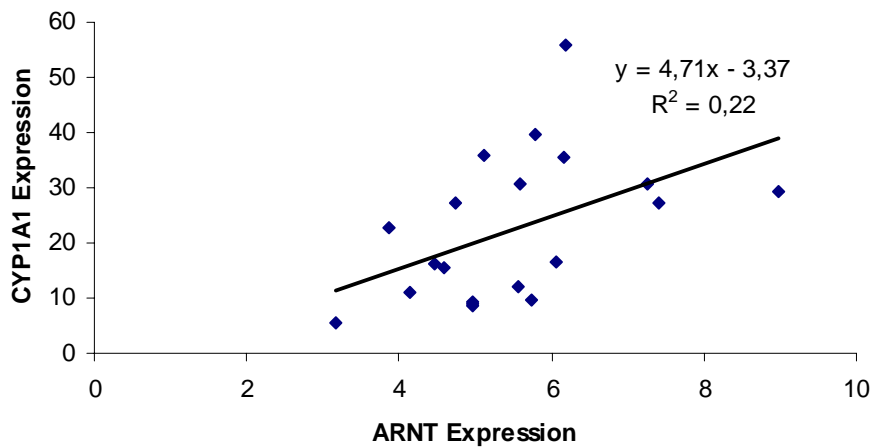


Figure 42 : Corrélation entre l'expression d'ARNT, d'AhR et de CYP1A1 dans les PBMCs des 20 sujets étudiés (expression = intensité de Cy3 / bruit de fond de Cy3).

4) Discussion

L'expression des gènes dans les PBMCs n'est pas toujours représentative de l'expression dans d'autres tissus. Cependant, si l'on considère que ces cellules sont impliquées dans différentes pathologies cardiovasculaires, via la voie de l'inflammation notamment, elles peuvent être utilisées pour étudier les gènes d'intérêt en physiopathologie cardiovasculaire. De plus, l'expression d'ARNm dans les PBMCs reste un bon biomarqueur pour évaluer les phénotypes liés aux différents EMXT et FT et donc pour monitorer par exemple, l'exposition ou les risques liés à certains xénobiotiques. Par exemple, Wibaut-Berlaimont et al., [176] proposent le leucocyte comme tissu de substitution pour l'étude de la réponse aux médicaments et de leur mécanisme d'action. A l'aide d'une puce Affimétrie®, ils ont ainsi décrit la régulation significative de 240 gènes (sur 12650) dans les PBMCs de sujets dyslipidémiques après traitement par atorvastatine. A noter, aucun EMXT ou TF ne figure parmi ces gènes.

En comparaison avec le foie, les concentrations en EMXT sont nettement plus faibles dans les PBMCs et de nombreux auteurs passent par des étapes de mise en culture ou d'induction pour étudier cette expression. De plus, la majorité des études d'expression de ces gènes est conduite par RT-PCR en temps réel. Dans ce travail, nous décrivons pour la première fois simultanément la présence d'un grand nombre d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de nombreux facteurs de transcription dans les PBMCs de sujets sains, sans étape d'induction préalable et par puce d'expression. Si cette expression était connue pour certains de ces gènes (Tableau X dans la partie introduction), nous sommes les premiers à rapporter l'expression de CYP2C18, CYP2J2 et CYP4F2 et d'un certain nombre de FT dans les lymphocytes de sujets sains. Par contre, nous ne détectons pas dans cette étude les CYP3As contrairement à ce qui a été rapporté par d'autres auteurs [147, 160, 165]. Une explication avancée par Krovat et al., [158] est la localisation préférentielle des CYP3A dans les lymphocytes B qui constituent seulement une faible part de nos cellules.

Déterminer les valeurs de référence et les variations biologiques chez le sujet sain est une étape fondamentale du développement d'un candidat biomarqueur. Les facteurs principaux de variabilité sont généralement le sexe, l'âge, les rythmes biologiques, l'IMC, l'alcool, le tabac, l'alimentation, les médicaments et les variants génétiques. La variabilité de l'expression des enzymes et facteurs de transcription étudiés dans ce travail est élevée. Cependant, nous ne mettons pas en évidence de différence en fonction de l'âge, du sexe ou de l'IMC comme d'autres études l'avaient fait [158, 225]. De plus, nous n'observons pas d'effet lié à l'heure ou à la saison de prélèvement contrairement à ce qui a été observé par certains auteurs [163, 169, 226]. Ceci peut s'expliquer par la faiblesse de notre effectif et par sa relative homogénéité.

En conclusion, contrairement à ce qui a été observé dans d'autres études [162, 172], nous montrons ici chez 20 individus qu'une majorité d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de facteurs de transcription sont exprimés de façon constitutive dans les cellules mononuclées du sang périphérique de sujets supposés sains. Les produits d'expression de ces gènes pourraient constituer des biomarqueurs dans le domaine cardiovasculaire facilement mesurables à grande échelle, par exemple dans le cadre d'essais cliniques. Le profil d'expression de ces gènes dans les PBMCs pourrait être un outil utile pour étudier les variations physiopathologiques de leur expression en fonction de l'environnement ou de la prise médicamenteuse mais cela donne également des perspectives pour l'étude des cycles métaboliques liés au système cardiovasculaire telles que l'inflammation, la régulation de la pression artérielle ou encore le métabolisme des lipides. Par exemple, les facteurs de transcription sont impliqués dans le métabolisme du cholestérol (LXR), des triglycérides (PPAR), des acides biliaires (VDR, FXR, LXR), des stéroïdes (CAR, PXR) ou de la bilirubine (CAR, PXR) [227]. Les PBMCs pourraient donc être utilisés pour étudier les relations entre facteurs de transcription et certains marqueurs en physiopathologie cardiovasculaire (dont des EMXT) exprimés dans les PBMCs.

Dans cette première partie de l'analyse transcriptomique, nous nous sommes attachés à évaluer par puces d'expression chez 20 sujets supposés sains de la Cohorte STANISLAS si les PBMCs seraient un tissu d'intérêt pour étudier l'expression d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de facteurs de transcription d'intérêt en physiopathologie cardiovasculaire. Nous montrons que :

1) la grande majorité des 16 enzymes de phase I et de phase II du métabolisme des xénobiotiques et des 13 facteurs de transcription étudiés sont exprimés à l'état basal dans les PBMCs de sujets sains,

2) il existe des corrélations significatives entre l'expression des facteurs de transcription et des CYP450 étudiés.

➔ Les PBMCs pourraient donc être de bons modèles pour étudier l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de facteurs de transcription considérés comme des marqueurs potentiels du risque cardiovasculaire.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Drug Metabolism and Disposition* (ARTICLE N°3).

B. Analyse quantitative de l'expression d'ABCB1 et de PXR par RT-PCR en temps réel

ABCB1 n'a pas été étudié avec la puce d'expression précédemment décrite. Nous avons donc par la suite étudié l'expression de ce transporteur dans les PBMCs par une technique de RT-PCR en temps réel. De plus, nous avons étudié l'expression de l'un des facteurs de transcription intervenant dans la régulation de l'expression d'ABCB1 : PXR, ce facteur ayant lui été évalué par la puce.

Dans un premier temps, nous avons donc déterminé les facteurs de variabilité inter-individuelle de l'expression d'ABCB1 et de PXR dans les PBMCs. Nous avons ensuite étudié s'il existe une corrélation entre l'expression du transporteur et de son facteur de transcription dans les PBMCs. Enfin, nous avons évalué si l'expression de PXR par RT-PCR était corrélée à l'expression par puce à ADNc.

1) Caractéristiques de l'échantillon étudié

L'échantillon de travail est composé de 83 individus de la cohorte STANISLAS également étudiés dans notre laboratoire en RT-PCR en temps réel pour d'autres molécules [228]. Ces 83 individus comprennent les 22 individus précédemment étudiés par puce. Les caractéristiques cliniques et biologiques (prélèvements sanguins) de cet échantillon sont présentées dans le tableau XXXVIII.

Tableau XXXVIII : Caractéristiques cliniques et biologiques des 83 sujets de la cohorte STANISLAS ayant fait l'objet d'une étude par RT-PCR en temps réel.

Variable	Hommes (n=42)	Femmes (n=41)	p (Mann-Whitney)
Age (années)	49,9±3,8	48,6±3,3	0,08
IMC (kg/m ²)	26,6±3,9	24,1±4	0,002
tabac non fumeur	19 (45,2%)	24 (58,5%)	
fumeur	6 (14,3%)	2 (4,9%)	
ex fumeur	17 (40,5%)	15 (36,6%)	0,26
Globules blancs (10 ⁹ /L)	5,75±1,42	5,82±1,44	0,87
Lymphocytes (10 ⁹ /L)	1,7±0,36	1,7±0,4	0,93
Créatinine (µmol/L)	92,4±9,7	77,1±7,7	<0,001
bilirubine (µmol/L)	15±5,6	11,3±4,3	0,001
GGT (UI/L)	39,1±24,5	18,1±8,5	<0,001
PAL (UI/L)	69,1±15,3	64,3±16,4	0,10
TGO (UI/L)	28,5±11	21±5,8	<0,001
TGP (UI/L)	33,9±19,1	22,9±11,5	<0,001
Glycémie (mmol/L)	5,6±0,57	5,15±0,43	<0,001
Cholestérol total (mmol/L)	5,84±0,79	5,7±0,88	0,47
Triglycérides (mmol/L)	1,22±0,56	1,01±0,53	0,035
HDL (mmol/L)	1,68±0,32	1,82±0,51	0,32
LDL (mmol/L)	3,58±0,79	3,4±0,77	0,45
ApoA1 (mmol/L)	1,63±0,2	1,67±0,26	0,70
ApoB (mmol/L)	1,07±0,19	1,01±0,18	0,14
CRP (mmol/L)	2,08±3,45	1,51±1,81	0,485
PAS (mmHg)	124±13,4	116,3±16,8	0,018
PAD (mmHg)	75±8,1	67,8±7,6	<0,001
ARNm RLP13A (nb copies/µL)	367545±119157	334407±119208	0,18
ARNm IL6 (nb copies/µL)	19±13	19±12	0,64
ARNm TNFA (nb copies/µL)	4126±4208	4405±5350	0,20
ARNm ABCB1 (nb copies/µL)	266±105	252±103	0,85
ARNm PXR (nb copies/µL)	16,3±6,4	13,10±4,84	0,014

Les femmes présentent un IMC, une pression artérielle, une glycémie, des taux de triglycérides, créatinine, bilirubine et enzymes hépatiques significativement plus faibles que les hommes.

A noter, 5 individus prennent des médicaments connus pour modifier l'expression du transporteur ABCB1 (inducteurs ou inhibiteurs) : 1 homme sous oméprazole (plus de nombreux autres médicaments dont des anti-hypertenseurs) et 4 femmes prenant respectivement de la spironolactone (et un autre antihypertenseur), de la carbamazépine, de la paroxétine (et de la simvastatine) et de l'amitryptiline. De plus, 2 autres sujets sont sous antihypertenseurs et 4 autres sont sous hypolipémiants. Cependant, ces sujets n'ont pas été exclus de l'étude car la prise de ces médicaments ne modifie pas les tests de corrélations effectués par la suite.

D'autre part, la répartition des génotypes pour les 8 polymorphismes d'ABCB1 étudiés ne diffère pas en fonction du sexe (Tableau XXXIX).

Tableau XXXIX : Répartition des génotypes observés dans l'échantillon de RT-PCR.

Polymorphisme (effectif total)	Effectifs hommes			Effectifs femmes			p (χ^2)
T-129C ^a (n=81)	TT	CT	TT	TT	CT	TT	0,58
G-1A ^a (n=69)	GG	GA	AA	GG	GA	AA	0,45
A61G ^a (n=69)	AA	AG	GG	AA	AG	GG	0,59
G1199A ^a (n=75)	GG	GA	AA	GG	GA	AA	0,56
C1236T (n=80)	CC	CT	TT	CC	CT	TT	0,73
T-76A (n=69)	TT	TA	AA	TT	TA	AA	0,67
G2677W ^b (n=81)	GG	GW	WW	GG	GW	WW	0,49
C3435T (n=79)	CC	TC	TT	CC	TC	TT	0,24

^a Le nombre d'homozygotes mutés étant inférieur à 5, ils sont groupés avec les hétérozygotes pour le test de χ^2 (11 vs 12+22)

^b W = T ou A

Dans cet échantillon, les fréquences de l'allèle muté pour les polymorphismes T-129C, G-1A, A61G, G1199A, C1236T, T-76A, G2677W et C3435T sont respectivement de 0,03 ; 0,065 ; 0,14 ; 0,06 ; 0,45 ; 0,435 ; 0,475 et 0,49. Chez les parents étudiés lors de l'analyse génétique (n=227) la fréquence de l'allèle muté pour ces mêmes polymorphismes était respectivement de 0,04 ; 0,08 ; 0,09 ; 0,06 ; 0,42 ; 0,46 ; 0,45 et 0,46 [188]. La répartition des génotypes observée dans l'échantillon de RT-PCR n'est donc pas différente de celle de l'échantillon des 227 parents étudiés lors de notre première partie d'analyse génétique (Tableau XL).

Tableau XL : Comparaison de la répartition des génotypes entre l'échantillon étudié en RT-PCR et l'échantillon parental étudié lors de l'analyse génétique.

Polymorphisme	RT-PCR			Analyse génétique			p (Chi-2)
T-129C ^a	TT	CT	TT	TT	CT	TT	0,59
	76	5	0	206	18	0	
G-1A ^a	GG	GA	AA	GG	GA	AA	0,52
	61	7	1	192	32	1	
A61G ^a	AA	AG	GG	AA	AG	GG	0,09
	51	17	1	185	35	3	
G1199A ^a	GG	GA	AA	GG	GA	AA	0,98
	67	7	1	199	22	2	
C1236T	CC	CT	TT	CC	CT	TT	0,82
	24	40	16	74	110	39	
T-76A	TT	TA	AA	TT	TA	AA	0,90
	22	34	13	68	110	48	
G2677W ^b	GG	GW	WW	GG	GW	WW	0,81
	20	45	16	64	118	43	
C3435T	CC	TC	TT	CC	TC	TT	0,72
	18	44	17	61	116	45	

^a Le nombre d'homozygotes mutés étant inférieur à 5, ils sont groupés avec les hétérozygotes pour le test de Chi-2 (11 vs 12+22)

^b W = T ou A

2) Expression d'ABCB1 et de PXR dans l'échantillon

La gamme étalon est constituée de 6 points de gamme allant de 1.10^3 à 1.10^8 copies/ μ L pour ABCB1 et de 4 points de gamme de $1,4. 10^4$ à $1,4.10^7$ copies par μ L de solution d'ADNc pour PXR. Ces courbes de calibration sont linéaires ($r^2=1$ pour ABCB1 comme pour PXR).

L'efficacité d'une PCR (Eff) est calculée selon la formule suivante : $\text{Eff} = 10^{-(1/\text{pente})} - 1$. Le coefficient de la pente étant de -3,83 pour ABCB1 et de -3,484 pour PXR, les rendements de PCR sont donc respectivement de 82% pour ABCB1 et de 94% pour PXR.

L'analyse des Ct permet de déterminer les coefficients de variation (CV) intra et inter-essais des PCR d'ABCB1 et de PXR. Un échantillon a été passé sur chacune des séries de PCR, permettant d'obtenir un CV inter-essai inférieur à 5% pour ABCB1 et pour PXR. Les CV intra-essais, déterminés grâce à la quantification dans une même série de PCR d'un échantillon en duplicat, sont également inférieurs à 5%.

2 sujets n'ont pas pu faire l'objet d'une quantification par RT-PCR pour ABCB1 et un sujet pour PXR soit à cause d'une mauvaise préparation de l'échantillon pour la PCR soit à cause d'une quantité insuffisante d'ARNm disponible.

Nous montrons que l'ARNm d'ABCB1 est exprimé chez tous les sujets (n=81 sujets ; m=261+/-104). La distribution de ce paramètre n'est pas normale (Skewness=0,41 ; Kurtosis=0,46 et Test de Kolmorov-Smirnov : p=0,02) mais n'a pas été log-transformée car ce phénomène est lié notamment à 5 valeurs anormalement hautes. De plus, l'ARNm de PXR est exprimé faiblement mais mesurable chez tous les sujets étudiés (n=82 sujets ; m=14,7+/-5,9). La distribution de ce paramètre est considérée comme normale (Skewness=0,43 et Kurtosis=0,16 ; Test de Kolmorov-Smirnov : p>0,15) malgré 4 valeurs anormalement basses.

Dans les PBMCs, les profils d'expression de nombreux gènes varient en fonction de la composition du sang, du sexe, de l'âge ou encore du rythme nyctéméral [225]. Nous nous sommes donc intéressés à la variabilité interindividuelle de l'expression d'ABCB1 et de PXR à l'aide de corrélations simples puis de régressions multiples.

3) Variabilité inter-individuelle de l'expression d'ABCB1

(a) Corrélations simples

Afin d'évaluer l'existence de relations entre l'expression de l'ARNm d'ABCB1 dans les PBMCs et différentes données biologiques et génétiques, nous avons calculé les coefficients de corrélation de Pearson dans la population globale et chez les hommes et les femmes séparément (Tableau XLI).

Tableau XLI : Corrélations entre différentes variables biologiques et génétiques et l'expression de l'ARNm d'ABCB1 dans les PBMCs (Test de Pearson, p<0,10).

	Population totale (n=81)		Hommes (n=42)		Femmes (n=39)	
	r	p	r	p	r	p
Age	0,24	0.029	0,26	0.097		
IMC	0,28	0.013			0,315	0.051
ABCB1 G1199A	0,19	0.096			0,37	0.027
Log Globules blancs					0,31	0.056
Lymphocytes					0,425	0.007
Monocytes			-0,305	0.049	0,32	0.048
GGT	0,20	0.082			0,30	0.077
Log TGP	0,205	0.065				
palc3					0,32	0.045
PAS	0,30	0.006			0,365	0.022
PAD	0,19	0.088				

r : coefficient de corrélation de Pearson, p=probabilité associée.

Nous montrons que l'expression de l'ARNm d'ABCB1 est significativement corrélée avec l'âge ($r=0,24$; $p=0,029$) et avec l'IMC ($r=0,28$; $p=0,013$) dans la population totale. De plus, l'expression d'ABCB1 est également corrélée avec la PAS ($p=0,006$) mais cette corrélation disparaît si on enlève de l'analyse les 4 sujets traités par antihypertenseurs. Enfin, l'expression d'ABCB1 tend à être corrélée avec le taux d'enzymes hépatiques de types GGT ou TGP ($p<0,10$).

Si l'on sépare la population en fonction du sexe, les corrélations avec l'âge et l'IMC (femmes : $p=0,051$ pour l'IMC) disparaissent, peut-être à cause d'une diminution de la puissance. Chez les femmes ($n=39$), il existe des corrélations significatives entre l'expression d'ABCB1 et le taux de globules blancs ($p=0,007$ pour les lymphocytes, $0,048$ pour les monocytes). Il existe également une corrélation avec le taux de PAL ($p=0,045$). D'autre part, il existe une corrélation entre l'expression d'ABCB1 et le polymorphisme G1199A ($p=0,027$) mais qui n'est pas considéré car le nombre de porteuses d'au moins un allèle muté est faible ($n=4$). Chez les hommes ($n=42$), l'expression d'ABCB1 n'est corrélée significativement qu'avec le taux de monocytes ($p=0,049$).

Nous avons également corrélé l'expression d'ABCB1 avec la prise des médicaments suivants :

- médicaments connus comme pouvant moduler l'expression d'ABCB1 ($n=5$ individus),
- hypolipémiants ($n=4$),
- anti-hypertenseurs ($n=2$),
- contraceptifs oraux ($n=8$ femmes),
- traitements hormonaux substitutifs ($n=10$ femmes).

Il n'existe aucune corrélation significative entre la prise de ces médicaments et l'expression du transporteur. Nous notons cependant une corrélation non significative entre l'expression d'ABCB1 et la prise de contraceptifs oraux ($r=0,205$) avec un p de $0,08$.

Enfin, aucune corrélation n'est notée ni avec le sexe, ni avec le tabac.

Nous présentons ci-après plus en détail les différents facteurs de variabilité interindividuelle de l'expression d'ABCB1 testés.

(i) Age

Nous avons montré que l'expression de l'ARNm d'ABCB1 est significativement corrélée avec l'âge ($r=0,24$; $p=0,029$), ce qui est représenté sur la Figure 43. Bien que notre effectif soit peu dispersé en âge, si nous séparons notre population en 2 tranches d'âge, nous montrons que l'expression d'ABCB1 est significativement plus élevée dans le groupe des sujets plus âgés ($m=226,9 \pm 84,0$ pour les 42-48 ans versus $m=290,4 \pm 111,1$ pour les 49-57 ans ; ($p=0,005$) (Figure 44).

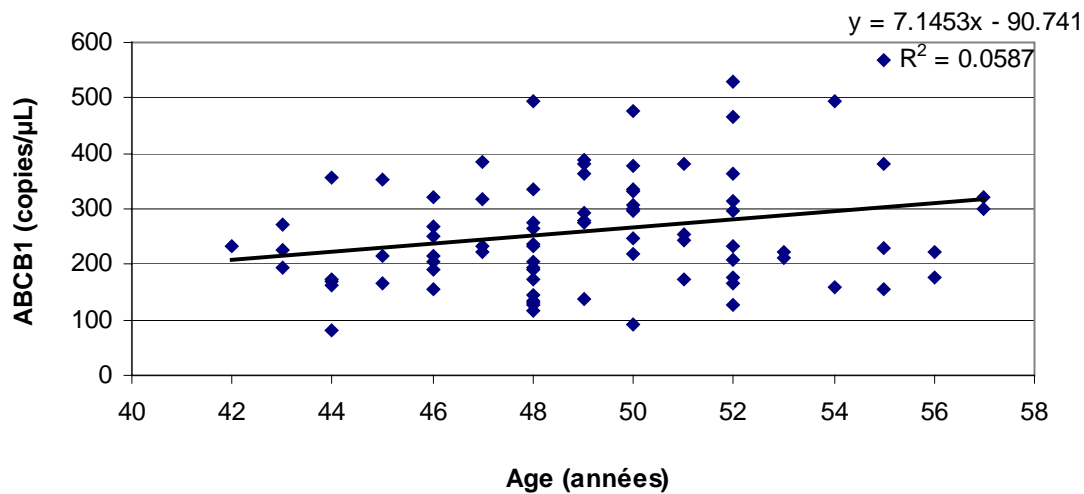


Figure 43 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et l'âge ($p=0,029$).

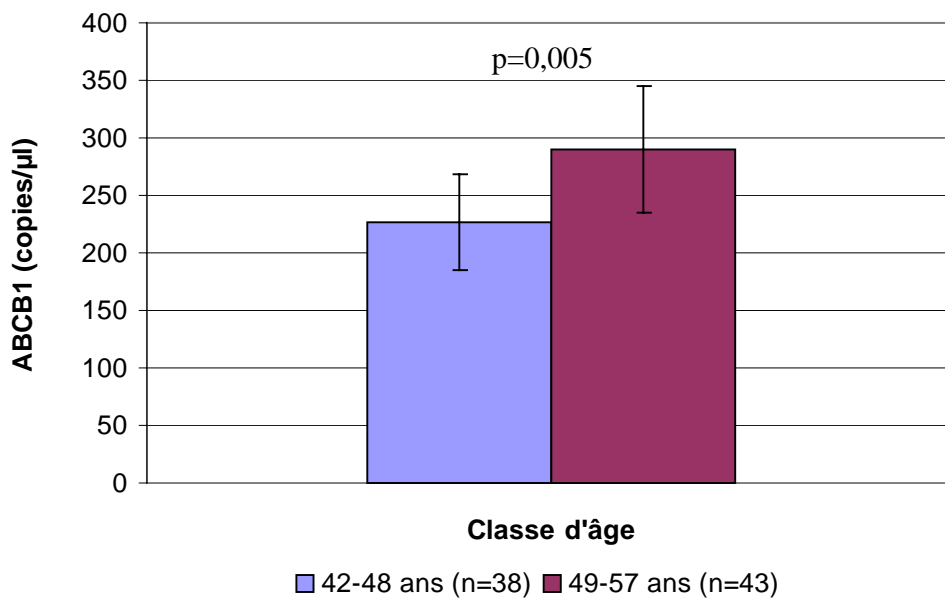


Figure 44 : Expression d'ABCB1 (en copies/μL) en fonction de la classe d'âge ($p=0,005$).

(ii) IMC

Nous montrons également que l'expression de l'ARNm d'ABCB1 est positivement corrélée avec l'IMC ($r=0,28$; $p=0,013$) dans la population totale ($p=0,051$ chez les femmes) (Figure 45). Si nous séparons notre population en fonction de son statut pondéral, nous montrons que l'expression d'ABCB1 tend à être plus élevée chez les personnes en surpoids ($m=242,3\pm 91,1$ pour les sujets avec $IMC < 25$ ($n=44$) et $m=282,4\pm 114,5$ chez les personnes ayant un $IMC > 25$ ($n=37$) ; $p=0,08$) (Figure 46).

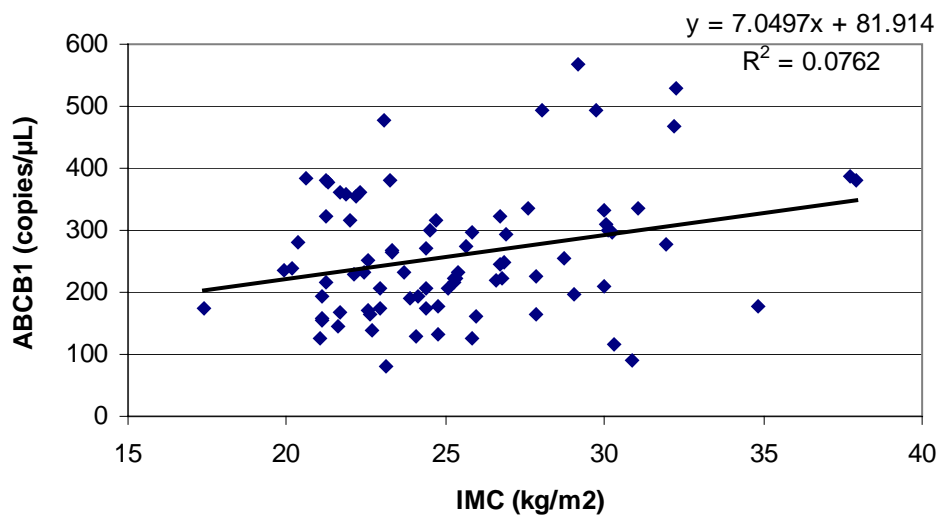


Figure 45 : Expression d'ABCB1 en fonction de l'IMC ($p=0,013$).

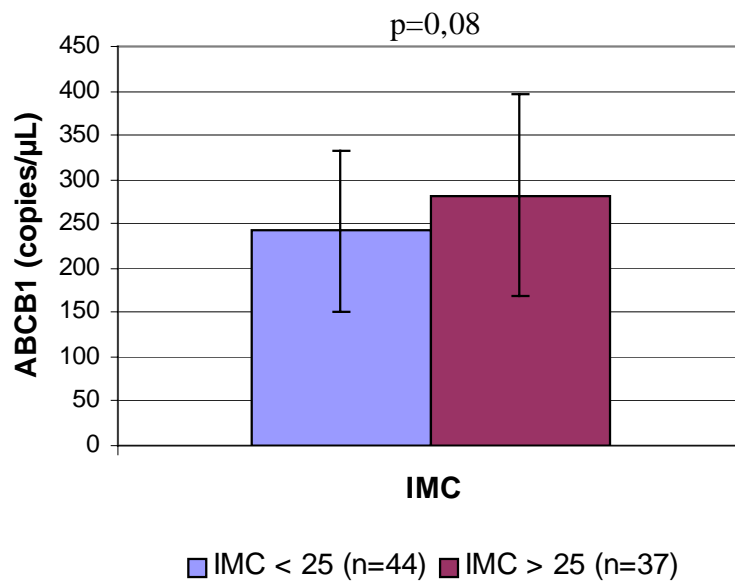


Figure 46 : Expression d'ABCB1 chez les sujets ayant un $IMC < 25$ et chez ceux ayant un $IMC > 25$ ($p<0,08$).

(iii) Globules blancs

Bien que dans la population totale et dans le sous-groupe hommes nous n'observons aucune association entre expression d'ABCB1 et taux de globules blancs (totaux ou sous-types cellulaires), il existe une corrélation significative chez les femmes entre taux d'ARNm d'ABCB1 et lymphocytes ($r=0,425$; $p=0,007$) (Figure 47) ou monocytes ($r=0,048$; $p=0,048$). Cette corrélation est de $0,31$ ($p=0,056$) pour le taux de globules blancs totaux exprimé en Log.

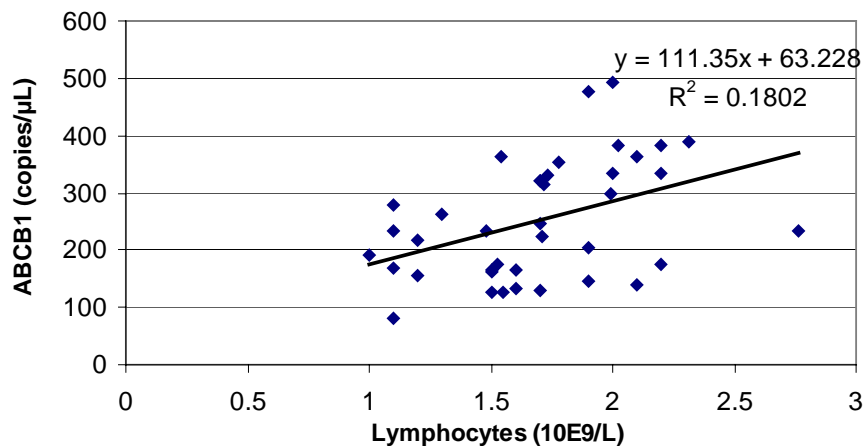


Figure 47 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et le taux de lymphocytes chez les femmes exclusivement ($p=0,007$).

(iv) Enzymes hépatiques

L'expression d'ABCB1 dans les PBMCs est corrélée non significativement aux taux plasmatiques de différentes enzymes hépatiques dont les GGT ($r=0,20$; $p=0,082$) (Figure 48) et la TGP (en Log, $r=0,205$; $p=0,065$) (Figure 49) dans la population totale. Il existe également une corrélation avec les PAL chez les femmes ($r=0,32$; $p=0,045$) (Figure 50) mais qui semble liée à 4 valeurs anormalement hautes (TGP > 60 UI/L).

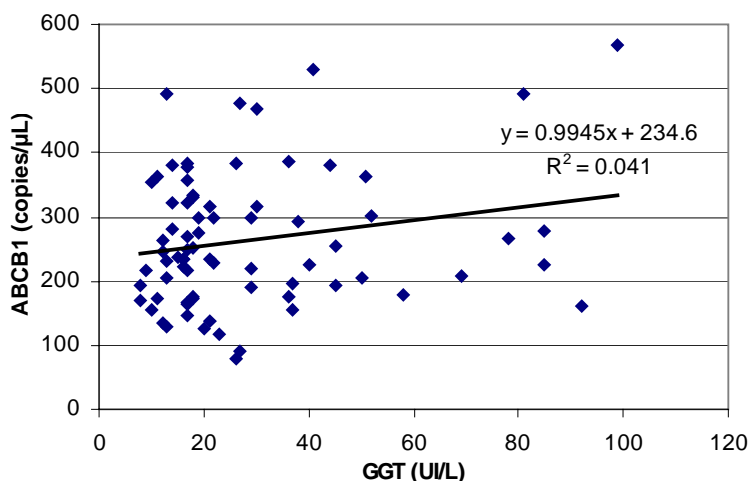


Figure 48 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et le taux de GGT ($p=0,082$).

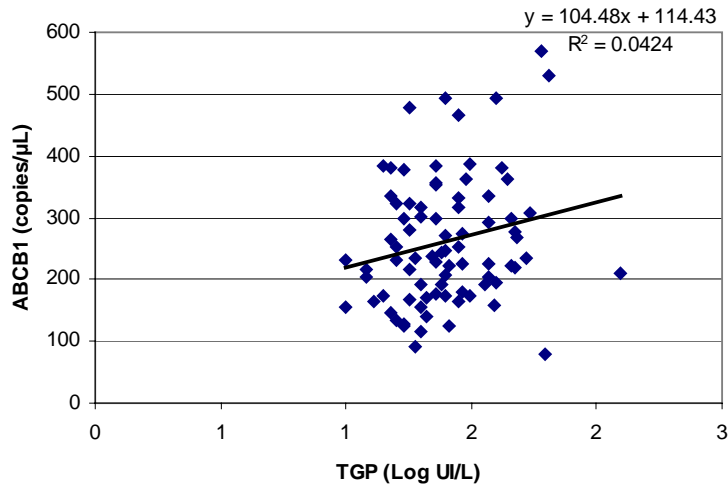


Figure 49 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et le taux de TGP ($p=0,065$).

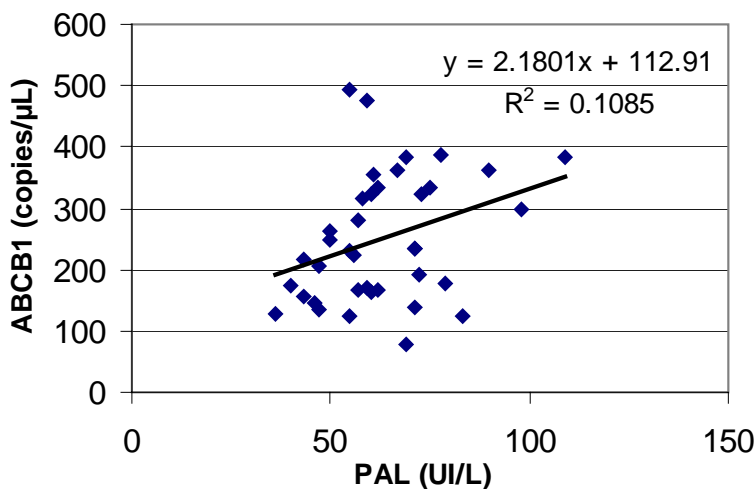


Figure 50 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et le taux de PAL chez les femmes exclusivement ($p=0,045$).

(v) Polymorphismes

L'étude des corrélations simples ne révèle aucune corrélation significative entre l'expression d'ABCB1 et les polymorphismes du transporteur excepté une corrélation entre l'expression d'ABCB1 et le polymorphisme G1199A ($p=0,027$). Cependant, celle-ci ne sera pas considérée car le nombre de porteuses d'au moins un allèle muté est faible ($n=4$).

Pour approfondir plus ces associations, nous avons réalisé un test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Au vu de l'effectif réduit de l'échantillon, seuls les polymorphismes pour lesquels la fréquence de l'allèle muté est supérieure à 40%, soit C1236T, T-76A, G2677W et C3435T, ont été considérés pour étudier l'effet des génotypes sur l'expression d'ABCB1.

Nous n'observons aucune association significative entre l'expression de l'ARNm d'ABCB1 et les génotypes des polymorphismes C1236T, T-76A, G2677W et C3435T d'ABCB1 dans la

population totale (Tableau XLII). De même, dans les sous-groupes hommes et femmes aucun test n'est significatif (résultats non présentés), excepté une association significative ($p=0,02$) observée chez les hommes entre l'expression d'ABCB1 et le polymorphisme C3435T. Cependant, celle-ci n'est pas prise en compte car elle ne représente pas un modèle génétique logique (expression plus élevée chez les hétérozygotes que chez les homozygotes sauvages ou mutés : CC : 303 ± 111 ; CT : 240 ± 92 et TT : 337 ± 126).

Tableau XLII : Comparaison de l'expression d'ABCB1 en fonction des génotypes pour *ABCB1* C1236T, T-76A, G2677W et C3435T (test non paramétrique de Kruskal-Wallis).

C1236T			p	T-76A			p
CC (n=24)	CT (n=40)	TT (n=16)		TT (n=22)	TA (n=34)	AA (n=13)	
238±88	262,5±118,05	284±85	0,25	259±81	245±98,5	248,35±100	0,92
G2677W^a			p	C3435T			p
GG (n=20)	GW (n=45)	WW (n=16)		CC (n=18)	CT (n=44)	TT (n=17)	
246±91	262±117,35	275±78	0,48	264±118	245±89,5	294±123	0,30

Au vu de l'effectif faible de sujets, nous n'avons pas approfondi ce travail par une étude haplotypique. Nous avons cependant comparé les moyennes entre les porteurs homozygotes sauvages pour G2677 et C3435 ($n=11$) et les porteurs homozygotes mutés pour 2677W et 3435T ($n=11$). Ces moyennes ne varient pas significativement ($m=253$ versus 299 ; $p=0,23$).

(b) Régressions multiples

Nous avons ensuite réalisé des analyses de régressions multiples afin de déterminer l'effet réel des différentes variables associées à l'expression d'ABCB1 lors des analyses de corrélations simples. L'effectif est réduit aux individus pour lesquels toutes les variables sont disponibles ($n=74$ car il manque un certain nombre de dosage pour les enzymes hépatiques notamment).

Dans la population globale, seule la corrélation de l'expression d'ABCB1 avec l'IMC persiste ($p=0,03$), la corrélation avec l'âge disparaît ($p=0,12$) après pris en compte de l'IMC. Ceci pourrait être lié à la diminution de l'effectif. Chez les femmes, c'est l'association avec l'IMC qui disparaît ($p=0,34$ après pris en compte de des lymphocytes) et seule persiste la corrélation avec les lymphocytes ($p=0,012$) tandis qu'aucune association n'est visible chez les hommes (Tableau XLIII).

Tableau XLIII : Corrélations significatives ($p \leq 0,05$) entre expression d'ABCB1 et différentes variables après analyse de régression multiple.

Variable indépendante	Population totale (n=74)			Femmes (n=36)		
	$\beta \pm SE$	r^2	p	$\beta \pm SE$	r^2	p
Intercept	104±71			169±36,5		
IMC	6±3	0,06 *	0,03 *	-	-	-
Log Lymphocytes	-	-	-	400,5±150,7	0,17 *	0,012 *

* ces valeurs diffèrent un peu de celles présentées pour les corrélations simples à cause de la différence d'effectif.

(c) Discussion : variabilité d'ABCB1 d'après la littérature

Nous observons dans ce travail que l'ARNm d'ABCB1 est exprimé dans les PBMCs de tous les sujets étudiés. Quelques études, synthétisées dans le Tableau XLIV, ont déjà rapporté l'expression physiologique d'ABCB1 dans les PBMCs de sujets sains ou malades (cf revue de [229]). Ainsi Asghar et al., [162] sont parmi les premiers à montrer chez des volontaires sains que tous expriment physiologiquement ABCB1 dans les PBMCs. L'expression d'ABCB1 que nous observons peut paraître faible en comparaison avec d'autres publications. Cependant, cela peut s'expliquer par une différence de présentation. En effet, nous exprimons nos résultats par 5 ng d'ADNc tandis que Oselin et al., [230] par exemple, observent des résultats de l'ordre 0,25 à $1,5 \times 10^3$ copies mais par ng d'ARN total. A noter, la protéine ABCB1 est composée de 2 parties homologues, une moitié C-terminale et une moitié N-terminale, elles-mêmes composées d'un domaine transmembranaire et d'un domaine liant l'ATP. En plus de la p-gp complète, il existerait dans les PBMCs une demi-pgp exprimée de façon constitutive et correspondant à la moitié C-terminale de la molécule et non glycosylée [230]. En fonction de la position des amorces choisies, ce phénomène pourrait expliquer les divergences de concentrations observées entre études.

Nous montrons ici que l'expression d'ABCB1 est corrélée positivement à l'IMC dans la population totale, l'âge disparaissant après régression multiple, et au taux de lymphocytes chez les femmes. De plus, nous ne mettons en évidence ni effet du sexe, ni du tabac, ni des médicaments, dont la contraception orale, ni des polymorphismes d'ABCB1 sur l'expression du transporteur. Peu d'auteurs se sont intéressés à l'analyse de la variabilité interindividuelle de l'expression d'ABCB1, notamment car les effectifs étudiés sont généralement réduits.

Comme nous le montrons dans ce travail, Asghar et al., [162] observent que l'expression ne diffère pas en fonction du sexe. De même, ils ne mettent pas en évidence d'effet de la contraception (n=7 femmes traitées et 18 femmes non traitées). Cela est cohérent avec l'absence d'expression d'ABCB1 en fonction du sexe ou du statut pré-post ménopause rapportée dans l'intestin [197] ou le foie [198].

Nous rapportons dans ce travail une corrélation significative entre l'expression d'ABCB1 et l'indice de masse corporelle. A notre connaissance, ceci n'avait encore jamais été rapporté. Parmi les autres EMXT, il a été rapporté que l'activité de CYP2E1 est corrélée positivement à l'IMC, à l'obésité et aux taux de cholestérol et de triglycérides chez l'homme [231]. De plus, l'expression de l'ARNm de CYP2E1 dans les PBMCs a été corrélée positivement aux taux de cholestérol plasmatique [157]. Ceci s'explique car CYP2E1 est inductible par ses substrats tels que les acides gras eux-mêmes liés à l'obésité ou à une consommation abusive d'alcool [232]. Si l'on considère que l'expression d'ABCB1 est induite par le cholestérol dans les PBMCs [37, 124], la corrélation observée dans ce travail entre expression d'ABCB1 dans les PBMCs et l'IMC est logique (de même qu'avec les enzymes hépatiques qui vont de paires avec l'IMC).

Nous notons également dans ce travail une corrélation positive entre l'expression d'ABCB1 et le taux de lymphocytes chez les femmes. Les lymphocytes sont les cellules clés de l'inflammation et il a été montré que l'inflammation pouvait moduler l'expression de l'ARNm d'ABCB1 y compris dans les PBMCs [233]. Cependant le sens de cette modulation n'est pas encore clairement défini avec des études sur des inflammations chroniques ou aiguës induites par les LPS et des différences en fonction du temps d'étude. Par exemple Englund et al., [234] observent une répression de l'expression d'ABCB1 lors d'inflammations intestinales chroniques tandis que d'autres auteurs décrivent une augmentation de son expression [235]. A noter, les corrélations que nous observons avec les globules blancs diffèrent en fonction du sous-type cellulaire considéré, l'association la plus forte étant observée avec les lymphocytes. Cela s'expliquerait car les lymphocytes seraient les cellules qui expriment le plus ABCB1. La variabilité de l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs serait élevée [113] avec des taux variants de 20 à 80% des lymphocytes B et de 30 à 100% des lymphocytes T [229]. Les différents sous-types cellulaires exprimeraient ABCB1 à différents niveaux. Les cellules en exprimant le plus seraient les *natural killers* CD56+ suivi, par les lymphocytes T CD8+ puis CD4+, les lymphocytes B CD19+, puis les monocytes CD14+ et enfin les granulocytes CD15+ (CD16+>CD8+>CD4+>CD19+>CD14+>CD15+) [230, 236]. Quelques études ont été conduites chez l'homme ou l'animal afin de déterminer l'effet de l'âge sur l'expression et l'activité d'ABCB1 dans différents tissus [27, 237]. D'après la revue de la littérature faite par Mangoni [237], il apparaît que l'âge a probablement un effet sur cette

expression et cette activité. Mais le sens de la modulation, augmentation ou diminution, reste sujet à conflit. Notamment, dans les PBMCs, tandis que certains auteurs associent un âge avancé à une augmentation de l'expression de l'ARNm d'ABCB1 et de son activité dans les lymphocytes [27], d'autres l'associent à une diminution de cette activité [237, 238]. Bien que notre échantillon soit peu dispersé en terme d'âge (42-57 ans), nous montrons qu'il existe une corrélation positive significative, avant prise en compte de l'IMC, entre l'âge et l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs. Ces divergences pourraient s'expliquer selon Mangoni par des différences méthodologiques (type cellulaire étudié, taille de l'échantillon, classe d'âge choisie) et par un biais possible dû à l'absence de considération des génotypes des individus qui pourraient influencer l'expression indépendamment de l'âge. Brenner et Klotz [239] ont étudié en parallèle à l'effet de l'âge, l'effet des polymorphismes C3435T et G2677T sur l'activité d'ABCB1 dans les cellules natural killer CD56+ (sous-type de lymphocytes qui exprimeraient le plus ABCB1) de 18 sujets âgés sains, 20 sujets âgés fragiles et 21 sujets jeunes sains. Cependant, ils ne mettent en évidence ni d'effet de l'âge ni d'effet des génotypes sur l'activité d'ABCB1 excepté dans le groupe des jeunes une activité plus faible chez les homozygotes mutés en position C3435T.

Dans ce travail, nous ne mettons en évidence aucun effet des 8 polymorphismes d'*ABCB1* sur l'expression de son ARNm. L'influence des polymorphismes d'*ABCB1* sur l'expression et l'activité du transporteur ABCB1 est controversée. De nombreuses études ont tentées d'associer les polymorphismes d'*ABCB1*, C3435T et G2677W notamment, et l'expression ou l'activité du transporteur dans différents tissus tels que le foie, le rein, le placenta, l'intestin ou les PBMCs mais ne rapportent le plus souvent aucune association significative [68, 72]. Concernant les PBMCs, la majorité des études ne concernent qu'un faible nombre de sujets, parfois issus de populations malades, et se limitent pour la plupart au polymorphisme C3435T (Tableau XLIV). En effet, comme le montre le Tableau XLIV, seules 11 études se sont intéressées à l'influence du polymorphisme C3435T d'ABCB1 sur son expression et/ou son activité dans les PBMCs dont quatre ont également étudié G2677W et une C1236T. 7 études ont été réalisées chez des sujets sains avec un effectif maximum de 46 sujets, une chez 69 sujets traités par statines, une chez 59 patients sous traitement anti-VIH, une chez 44 patients atteints de tumeurs ou d'infections hépatiques et une chez 22 sujets atteints de LLC chimionaiifs.

Selon plusieurs auteurs, il y aurait une association significative entre le polymorphisme C3435T et l'expression et/ou l'activité du transporteur dans les PBMCs. L'allèle muté a ainsi été associé à une diminution de l'expression et/ou de l'activité chez des sujets malades [85, 240] et sains [241, 242] (tendance exclusivement pour [114, 230]). Cependant, d'autres auteurs ne mettent en évidence aucun effet de ce polymorphisme. Ainsi, Oselin et al., [230] ne

montrent pas d'effet de C3435T, ni de G2677T, sur l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs chez 45 sujets sains. De même, cette équipe ne démontre pas d'effet de ces 2 polymorphismes sur l'activité d'ABCB1 (mesurée par Rh123) dans les PBMCs de 46 hommes caucasiens supposés sains [243]. Quelques études de sujets malades ne mettent pas non plus en évidence d'effet des polymorphismes C3435T et G2677W sur l'expression ou l'activité du transporteur [113]. L'une des études ayant le plus fort effectif est celle de Rodrigues et al., [244] sur les PBMCs de 69 sujets hyperlipémiques répartis en 18 CC3435, 37 CT et 14 TT. Ces auteurs ne mettent en évidence aucune association entre génotype et expression de l'ARNm d'ABCB1 que ce soit avant ou après traitement par statine. A noter, ces auteurs remarquent une corrélation négative significative entre expression de l'ARNm d'ABCB1 et la réduction du taux de cholestérol total suivant le traitement par statines. Récemment, La Porte et al., [245] se sont intéressés à l'effet de 3 polymorphismes : C3435T, G2677W et C1236T chez 15 hommes sains. Là encore, ces auteurs ne montrent aucune différence d'expression ou d'activité d'ABCB1 dans les PBMCs en fonction des génotypes.

Ces disparités pourraient s'expliquer par des différences de design des études, des différences de populations étudiées, des différences de techniques de quantification utilisées ou encore par des différences de sous types cellulaires étudiés. Nous souhaitons approfondir les résultats de la littérature en travaillant sur un effectif beaucoup plus important de sujets sains (quasi le double des plus grosses études réalisées jusqu'alors) et sur un nombre plus important de polymorphismes. En accord avec les derniers auteurs cités, nous n'observons aucun effet des 8 polymorphismes étudiés sur l'expression du transporteur dans les PBMCs de 81 sujets sains.

Tableau XLIV : Expression d'ABCB1 dans les PBMCs de sujets sains ou malades. Effet des polymorphismes d'ABCB1.

Réf	Population (effectif)	Tissus	Polymorphismes Etudiés	Phénotypes (ARNm et/ou protéine)	Gènes domestiques	Technique de quantification	Association significative ou non entre génotype et expression(s) dans les PBMCs
Cette étude (+PXR)	Sujets sains (82)	PBMCs		ARNm			
[236]	Volontaires sains (10)	PBMCs	non	Activité (Rh123)			Pas étudié
[162] (+CYPs)	Volontaires sains (37)	PBMCs	non	ARNm		Intensité de la bande d'ADNc/competitive Reference standard RNA	Pas étudié
[246]	21 patients âgés avec cancer hépatocellulaire et 20 hommes jeunes sains	PBMCs (et foie)	non	ARNm	GAPDH et β actine		Pas étudié NB : pas d'association entre expression dans foie et dans PBMCs
[126]	1 volontaire homme	PBMCs	non	Activité (Rh123)			Pas étudié NB : charge des PBMCs en cholestérol augmente l'activité d'ABCB1
[238]	20 sujets avec LDL élevé mais non traités et 28 contrôles	PBMCs	Non	ARNm Activité (Rh123)			Pas étudié NB : pas de corrélation entre taux LDL plasmatique et concentration intracellulaire en cholestérol ou activité d'ABCB1 dans les PBMC
[85]	Caucasiens sous traitement VIH (59)	PBMCs	C3435T	ARNm Activité (anticorps UIC2)	β actine	Ajusté sur β actine	CC>CT>TT
[241]	Caucasiens sains (30)	PBMCs CD56+ NK cells	C3435T	ARNm (PBMCs), activité (Rh123, CD56+ NK cells)	Cyclophiline	Ajusté sur cyclophiline	Effet sur l'activité (NS pour expression) CC>CT>TT
[242]	Volontaires caucasiens supposés sains (19)	PBMCs	C3435T	ARNm, protéine	GAPDH	Ratio ABCB1/GAPDH	Oui (expressions plus faibles en présence au moins un muté) CC>CT>TT

[240]	Patients avec leucémie et chimio-naïfs (22)	PBMCs	C3435T	Activité (Rh123)		Intensité de la bande d'ADNc/ concentration totale en ARN de l'échantillon	Oui CC>CT>TT
[114] (+PXR)	Volontaires caucasiens supposés sains (18)	PBMCs	C3435T	ARNm	GAPDH	Ratio ABCB1/GAPDH	Non (mais tendance expression plus faible en présence au moins un muté)
[230]	Jeunes volontaires caucasiens supposés sains (45)	PBMCs (CD56+, CD8+, CD4+, CD19+)	C3435T G2677T	ARNm	β2 microglobuline		Non (mais tendance expression plus faible en présence au moins un muté)
[243]	Hommes sains volontaires caucasiens (46)	PBMCs (CD56+, CD4+)	C3435T G2677T	Activité (Rh123)			Non
[245]	Hommes caucasiens supposés sains (15)	PBMCs	C3435T, G2677T/ A et C1236T seuls ou en haplotypes	ARNm, Activité (Rh123)		Intensité de la bande d'ADNc/ concentration total en ARN de l'échantillon	Non CC=TT GG=GW=WW CC=CT=TT Haplotypes identiques
[233]	Sujets sains japonais (15)	PBMCs soumis in vitro à inflammation aigue mimée par LPS	C3435T	ARNm, Activité (calcein-AM)	β-actine	Ratio ABCB1/ β-actine	Pas de différence à l'état basal. Après traitement au LPS, diminution plus importante de la fonction chez les CC
[113] (+PXR)	Patients avec tumeurs hépatiques ou echinococose (44)	PBMCs (+ foie, intestin)	C3435T, G2677T	ARNm, protéine	β2 microglobuline (rejet de β actine et GAPDH)	Ratio (médiane (ABCB1 échantillon)/médiane (Gène domestique échantillon))/ (médiane (ABCB1 calibrateur)/médiane (Gène domestique calibrateur))	Non CC=CT=TT GG=GT=TT
[244] (+HepG2)	Hyperlipémiqes traités par atorvastatine (69)	PBMCs	C3435T	ARNm	GAPDH		Non significatif avant comme après traitement par statine

(d) Discussion de la technique de quantification

Pour optimiser le mieux possible la quantification des gènes d'intérêt, de nombreux auteurs ajustent leur résultats sur l'expression de gènes de référence, ou gènes domestiques, qui sont des gènes supposés être exprimés de façon constante et non sensibles à des facteurs d'induction ou de répression [247]. Actuellement, de nombreux gènes domestiques, tels que la β -actine, la GAPDH (ou GAPD) et l'ARN ribosomal 18s, sont remis en question parce leur transcription est régulée de façon significative au moins dans certains tissus [113, 248]. Leur expression ne peut donc être dite indépendante des conditions expérimentales (ou constante), ce qui peut conduire à fausser les résultats. Il apparaît nécessaire de tester plusieurs gènes domestiques en parallèle à la mesure de l'expression d'un gène d'intérêt dans un tissu donné pour choisir la meilleure référence possible. Plutôt que la GAPDH ou la β -actine, Albermann et al., [113] ont ainsi préféré utiliser comme référence la β -2 microglobuline qui serait exprimée de façon plus stable et qui a déjà été utilisé dans d'autres études de quantification de l'expression de l'ARNm d'*ABCB1* [230]. En parallèle à *ABCB1*, d'autres gènes ont fait l'objet d'une étude d'expression par RT-PCR en temps réel dans la cohorte STANISLAS. C'est le cas notamment du gène domestique *RPL13A* (*ribosomal protein L13a*). Ce gène de référence, bien que peu utilisé jusqu'ici dans la littérature, a été montré comme étant l'un des gènes dont l'expression est la plus stable y compris en comparaison à la β -actine, la GAPDH ou à l'ARNr 18s dans des cellules cartilagineuses [249], rénales [250], cancéreuses de la prostate et du sein [251] ou encore dans des cellules pancréatiques [252]. Cependant, pour utiliser un gène comme référence pour l'expression d'un autre gène, il est nécessaire que leur niveau d'expression soit très proche. Malheureusement, il apparaît ici que le niveau d'expression de la *RPL13A* chez nos individus est au moins 1000 fois plus élevé que celui d'*ABCB1* ou *PXR* (environ 200000 à 600000 copies par μ L d'ADNc). Nous n'avons donc pas utilisé ce gène de référence dans ce travail.

Au lieu de travailler en valeur relative nous nous sommes donc exprimés en valeur absolue. Certains auteurs quantifient leur expression en nombre de copies par ng d'ARN. Nous avons préféré exprimer notre expression en nombre de copies pour 5ng d'ADNc pour tous les individus. Cela nous permet de simplifier et de diminuer le risque d'erreur de nos techniques de travail en évitant une étape supplémentaire de dosage de l'ARN extrait et en procédant à la transcription inverse directement à la suite de l'extraction.

4) Variabilité interindividuelle de l'expression de PXR

(a) Corrélations simples

L'ARNm de PXR est exprimé faiblement chez tous les sujets étudiés ($m=14,7\pm 5,9$). Afin d'évaluer l'existence de relations entre l'expression de l'ARNm de PXR dans les PBMCs et l'âge, le sexe, le tabac, l'IMC et différentes données biologiques et génétiques, nous avons calculé les coefficients de corrélation de Pearson dans la population globale et chez les hommes et les femmes séparément (Tableau XLV).

Tableau XLV : Corrélations entre différentes variables et l'expression de l'ARNm de PXR dans les PBMCs (Test de Pearson).

	Population totale (n=80)		Hommes (n=41)		Femmes (n=39)	
	r	p	R	p	r	p
Sexe	-0,27	0.014				
ABCB1 T-129C			-0,26	0.100		
GGT	0,27	0.019	0,26	0.120		
TGO	0,20	0.071				

r : coefficient de corrélation de Pearson, p = probabilité associée.

Nous montrons que l'expression de l'ARNm de PXR est significativement corrélée avec le sexe ($r=-0,27$; $p=0,014$). Comme pour ABCB1, l'expression de PXR serait également corrélée avec le taux d'enzymes hépatiques (GGT : $p=0,019$; TGO : $p=0,071$). Il est intéressant de noter que chez les hommes, l'expression de PXR tendrait à être corrélée au polymorphisme T-129C de la région promotrice du gène codant ABCB1. Cependant, seul 2 hommes sont hétérozygotes pour ce polymorphisme.

Contrairement à ce que nous observions pour ABCB1, il n'y a aucune corrélation significative de l'expression de PXR avec l'IMC, l'âge ou le taux de globules blancs. Il n'y a pas non plus de corrélation avec le tabac ou les médicaments, y compris les contraceptifs.

Nous avons analysé ci-dessous plus en détail les facteurs potentiels de variabilité interindividuelle de l'expression de PXR.

(i) Sexe

L'expression de l'ARNm de PXR est significativement corrélée au sexe (Tableau XLV). En effet, comme nous le montrons sur la figure 51, les femmes expriment moins d'ARNm de PXR que les hommes ($m=3,15\pm 4,85$ versus $m=16,3\pm 6,4$; $p=0,014$).

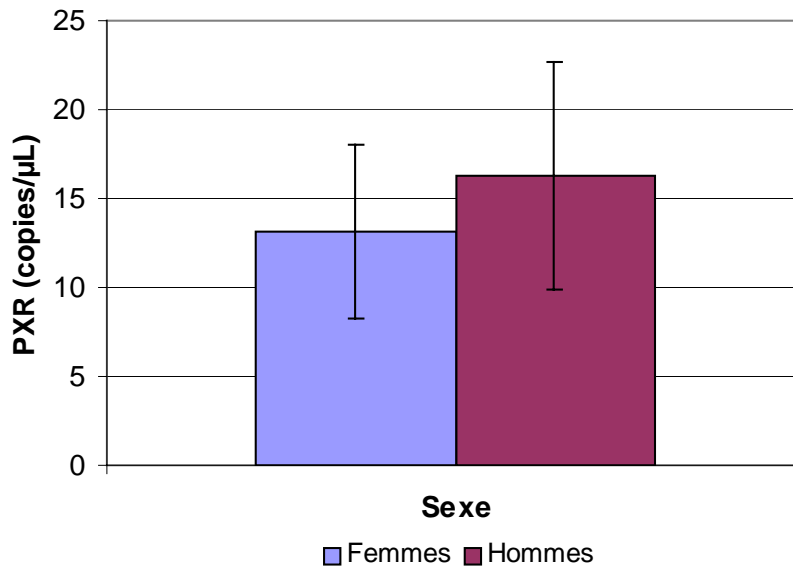


Figure 51 : Expression de PXR en fonction du sexe ($p=0,014$).

(ii) Enzymes hépatiques

L'expression de PXR dans les PBMCs est corrélée aux taux plasmatiques de GGT ($r=0,27$; $p=0,019$) et tend à l'être avec la TGO ($r=0,20$; $p=0,071$; disparaît si l'on enlève les 2 valeurs hautes extrêmes) dans la population totale (Figures 52 et 53).

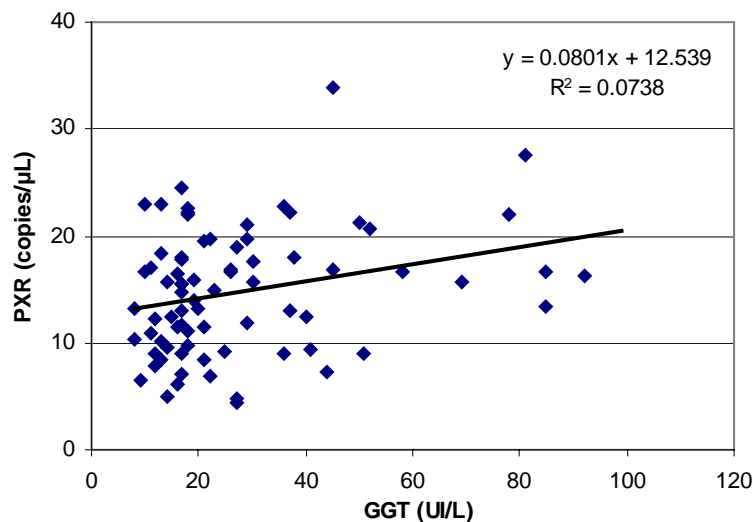


Figure 52 : Corrélation entre l'expression de PXR et le taux de GGT ($p=0,019$).

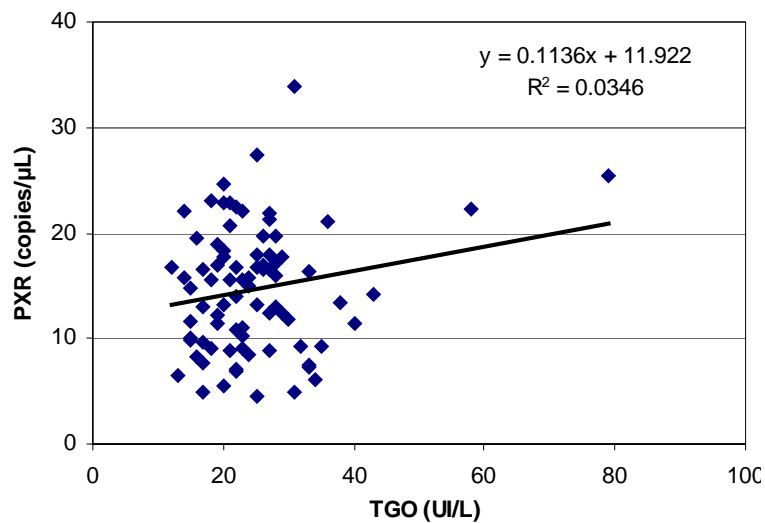


Figure 53 : Corrélation entre l'expression de PXR et le taux de TGO ($p=0,071$).

(iii) Polymorphismes d'*ABCBI*

Nous avons réalisé des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis en ne considérant que les polymorphismes C1236T, T-76A, G2677W et C3435T. Il apparaît que les polymorphismes C1236T, T-76A, G2677W et C3435T ne sont pas associés à l'expression de PXR dans la population totale (Tableau XLVI) et de même chez les hommes et les femmes séparément (résultats non présentés).

Tableau XLVI : Comparaison de l'expression de PXR en fonction des génotypes pour *ABCBI* C1236T, T-76A, G2677W et C3435T (Tests non paramétriques de Kruskal-Wallis).

C1236T (n=79)			p	T-76A (n=69)			p
CC (n=24)	CT (n=39)	TT (n=16)		TT (n=22)	TA (n=34)	AA (n=13)	
13,6 ± 7,1	15,8 ± 5,5	13,7 ± 4,8	0,18	14,5 ± 4,7	14,6 ± 5,6	15,7 ± 8,8	0,92
G2677W^a (n=80)			p	C3435T (n=78)			p
GG (n=20)	GW (n=44)	WW (n=16)		CC (n=18)	CT (n=44)	TT (n=16)	
13,2 ± 6,1	15,9 ± 6,0	13,5 ± 4,8	0,20	14,0 ± 5,0	15,3 ± 6,5	14,4 ± 5,5	0,85

(b) Régressions multiples

Nous avons ensuite réalisé des analyses de régressions multiples afin de déterminer dans la population totale, et chez les hommes et les femmes séparément, l'effet réel des différentes variables associées à l'expression de PXR lors des analyses de corrélations simples. L'effectif est réduit aux individus pour lesquels toutes les variables sont disponibles.

Dans la population globale, la corrélation de l'expression de PXR avec la GGT (en Log) disparaît, seule la corrélation avec le sexe persiste ($p=0,015$) (Tableau XLVII). Chez les hommes, comme chez les femmes, aucune corrélation n'est significative.

Tableau XLVII : Corrélations significatives ($p<0,05$) entre expression de PXR et différentes variables après analyse de régression multiple.

Variable indépendante	Population totale (n=74)		
	$\beta \pm SE$	r^2	p
Intercept	$19,6 \pm 2,05$	-	-
Sexe	$-3,25 \pm 1,3$	0,08 *	0,015 *

* A noter, ces valeurs diffèrent un peu de celles présentées pour les corrélations simples à cause de la différence d'effectif.

(c) Discussion : variabilité de PXR d'après la littérature

Nous montrons dans ce travail que l'ARNm de PXR est exprimé chez tous les sujets mais faiblement. Les variations d'expression ne peuvent donc être étudiées sérieusement. Peu d'études se sont attachées à étudier l'expression de PXR dans les PBMCs [113, 114, 116]. Dans une étude sur 5 sujets sains, Schote et al., [116] observent que, comme une vingtaine d'autres facteurs de transcription, PXR est exprimé dans les lymphocytes T CD4+ et CD8+, B CD19+ et les monocytes CD14+ de tous les sujets. En 2004, Owen et al., ont étudié par RT-PCR en temps réel si PXR est exprimé ou non dans les PBMCs de sujets sains ne prenant aucun médicament sachant que des premières études de Northern blot étaient négatives [114]. D'après ces auteurs, PXR est exprimé, mais 250 fois moins dans les PMBCs que dans le foie [114].

Nous rapportons que l'expression de PXR diffère significativement en fonction du sexe. Peu d'études se sont intéressées à l'étude de la variabilité interindividuelle de PXR dans les PBMCs comme dans les autres tissus. Wolbold et al., ont étudié la variabilité interindividuelle de l'expression de CYP3A4, ABCB1 et PXR dans des échantillons issus de chirurgie hépatique. Ils ne mettent en évidence ni effet du sexe, ni du tabagisme ou de l'alcool sur la variabilité interindividuelle [198] tandis que nous montrons une expression différentielle de PXR dans les PBMCs en fonction du sexe. Owen et al., n'ont pas étudié les facteurs de variabilité interindividuelle de l'expression de PXR chez leurs 18 sujets. Cependant, ils ont regardé l'effet des polymorphismes d'*ABCB1* sur l'expression de PXR. Comme on pouvait s'y attendre (puisque ce polymorphisme n'est pas situé dans la région promotrice), Owen et al., ne mettent pas en évidence d'association entre le génotype des sujets pour *ABCB1* C3435T et l'expression de PXR dans les PBMCs [114].

Nous n'avons étudié aucun polymorphisme de PXR dans ce travail. Cependant, le gène *NR1I2* codant PXR est polymorphe et certains variants affecteraient l'expression de PXR et pourraient par ce biais altérer également l'expression d'*ABCB1* et son activité de transport et la réponse à certains traitements médicamenteux [112]. Ceci pourrait notamment expliquer les contradictions observées dans la littérature concernant l'effet des polymorphismes d'*ABCB1* (affectent l'expression ou l'activité du transporteur ou la réponse à un médicament dans certaines études mais pas dans d'autres). Certaines équipes se sont donc intéressées aux polymorphismes génétiques et aux transcrits de PXR pour expliquer cette variabilité. Tout d'abord, l'expression de l'ARNm de PXR a été significativement corrélée avec l'expression d'*ABCB1* dans les cellules du sang périphérique et dans le foie/l'intestin. De plus, il a été montré que l'expression d'*ABCB1* dans les capillaires cérébraux est régulée au niveau transcriptionnel par l'exposition à des ligands de PXR. Enfin, les génotypes d'*ABCB1* pourraient influencer le phénotype basal ou induit de CYP3A4 via la régulation des taux de ligands de PXR [112]. Le gène codant PXR (*NR1I2*) est localisé en 3q11-13 et est composé de 9 exons. A ce jour, plus de 55 variants ont été identifiés [253]. Certains variants affecteraient l'expression de base ou la fonction d'induction de PXR, résultant dans des variations de l'expression de CYP3A4 ou de PXR au niveau hépatique ou intestinal [112, 254, 255]. Il a ainsi été démontré que les hétérozygotes pour *PXR* A11156C ou T11193T ont des taux 1,45 fois moins élevés d'*ABCB1* dans des biopsies intestinales que les homozygotes sauvages [256]. Cependant, quelques études ont regardé l'effet des polymorphismes de *PXR* sur la réponse à certains traitements médicamenteux sans résultats significatifs à l'heure actuelle même s'il y avait association significative entre polymorphismes d'*ABCB1* et réponse au

traitement (paclitaxel [257], docetaxel et daunorubicine [258], tamoxifène [259] ou traitement de l'épilepsie [112]).

5) Corrélation entre expression d'ABCB1 et de PXR

(a) Corrélation entre expression d'ABCB1 et de PXR dans notre étude

Les corrélations simples ne mettent en évidence aucune corrélation entre expression d'ABCB1 et de PXR que ce soit dans la population totale (n=80, $r=-0,065$; $p=0,57$) (Figure 54) ou en fonction du sexe (hommes $r=-0,025$; $p=0,87$ et femmes : $r=-0,15$; $p=0,35$), y compris en cas d'exclusion des 5 sujets traités par inducteurs ou inhibiteurs médicamenteux d'ABCB1 (résultats non présentés). Les variables d'ajustements étant différentes entre ABCB1 et PXR, aucun ajustement ne peut être réalisé.

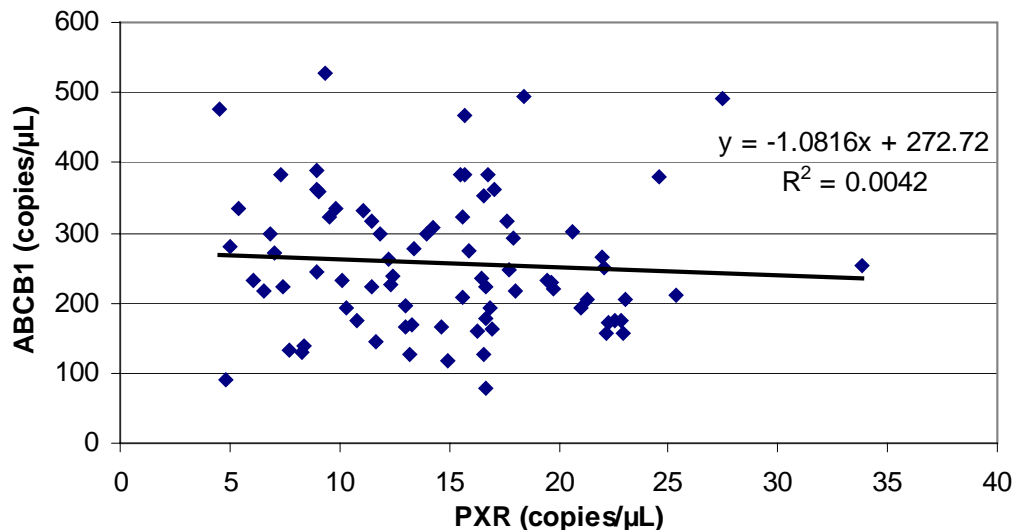


Figure 54 : Corrélation entre l'expression d'ABCB1 et de PXR ($p=0,57$).

(b) Discussion d'après la littérature

PXR est un facteur de transcription connu pour réguler l'expression d'ABCB1 dans de nombreux tissus dont les PBMCs d'après certains auteurs. Ainsi, Owen et al., ont montré que l'expression de l'ARNm de PXR et l'expression de l'ARNm d'ABCB1 sont corrélées dans les PBMCs de 18 volontaires sains [114]. Albermann et al., confirment ces données dans les PBMCs de 44 sujets porteurs de tumeurs hépatiques [113]. De plus, ils montrent que cette corrélation est également observée dans l'intestin mais pas dans le foie [113]. A noter, ces auteurs ne mettent pas en évidence de corrélation entre l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs et son activité dans les lymphocytes [113].

Bien que notre effectif soit supérieur à celui des études d'Owen et al., et d'Albermann et al., nous ne mettons en évidence aucune corrélation entre l'expression de l'ARNm d'ABCB1 et de PXR dans les PBMCs des sujets que nous avons étudiés par RT-PCR en temps réel. Il faut souligner que l'expression de PXR obtenue pour ce travail est faible et pourrait ainsi biaiser notre étude expliquant ce résultat négatif. Il serait intéressant de reproduire cette expérience en cherchant un couple d'amorces ou un programme de PCR plus performant. Toutefois, Asghar et al., [162] ont évalué chez 50 volontaires sains l'effet inducteur de la rifampicine (agoniste de PXR) sur l'expression d'ABCB1 et de divers CYP450 dans les lymphocytes. Contrairement à ce qui est observé dans d'autres tissus, ils ne montrent aucun effet inducteur de la rifampicine sur ABCB1. Ils proposent que cela soit lié à une expression plus ou moins tissu-spécifique de PXR avec une expression interindividuelle inconstante. Par exemple, le rein n'exprime pas PXR et ABCB1 n'est pas induit par la rifampicine dans ce tissu [162]. Cela pourrait également être lié à une expression tissu-spécifique de co-activateurs ou de co-represseurs de la transcription de PXR [172]. C'est ainsi l'explication avancée par Haas et al., [172] pour expliquer l'absence de relation entre l'expression de CYP450, régulés par PXR, dans les PBMCs et leur activité enzymatique dans d'autres tissus. La régulation de l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs pourrait faire appel majoritairement à d'autres facteurs de transcription que PXR. Par exemple, CAR est capable de moduler l'expression d'ABCB1 et est exprimé dans les PBMCs [116]. Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est encore penchée sur les relations entre ABCB1 et CAR dans les PBMCs.

6) Corrélation de l'expression de PXR par RT-PCR et par la puce d'expression

Dans l'étude sur les puces, nous montrions que PXR était le facteur de transcription le plus exprimé dans les PBMCs. En effet, PXR était significativement exprimé chez 19 sujets sur 20 avec un rapport intensité Cy3/bruit de fond Cy3 moyen d'environ 17,5 et un coefficient de variation de 43%, l'expression n'étant pas significative pour l'individu de la puce n°11. Par RT-PCR en temps réel, nous montrons que PXR est exprimé chez tous les individus y compris chez l'individu de la puce 11 (Tableau XLVIII).

Tableau XLVIII : Expression de PXR par puce à ADNc et par RT-PCR.

N° d'individu (numsta3)	N° Puce	Résultats puce (intensité Cy3/bruit de fond Cy3)	Résultats qRT-PCR (nb copies/5ng ADNc)
10035	1	26,66	7,06
10042	2	15,43	6,83
10043	3	17,17	12,21
10124	4	25,10	9,85
10141	5	6,57	9,22
10190	6	37,27	16,63
10268	7	14,06	9,34
10270	8	30,31	5,45
10299	9	16,73	6,53
10305	10 ^b	non analysable	16,78
10340	11 ^b	12,75 ^a	14,26
10363	12	23,79	7,34
10370	13	9,64	9,57
10447	14	23,51	17,99
10455	15	18,05	14,02
10463	16	21,89	15,50
10475	17	25,20	4,49
10563	19	11,56	8,94
10569	20	14,53	15,72
10593	21	14,25	11,85
10722	22 ^b	38,36	non analysé

^a p non significatif, donc considéré comme non exprimé.

^b non étudié dans l'étude de corrélation.

Tandis que la RT-PCR en temps réel permet une quantification absolue, la puce d'expression ne délivre normalement qu'une information qualitative. Toutefois, comme nous avons observé grâce à ces puces des corrélations significatives entre l'expression de plusieurs gènes dont PXR et les CYP2Cs, nous avons essayé de corréler les valeurs d'expression obtenues pour chaque individu par les 2 techniques (Figure 55).

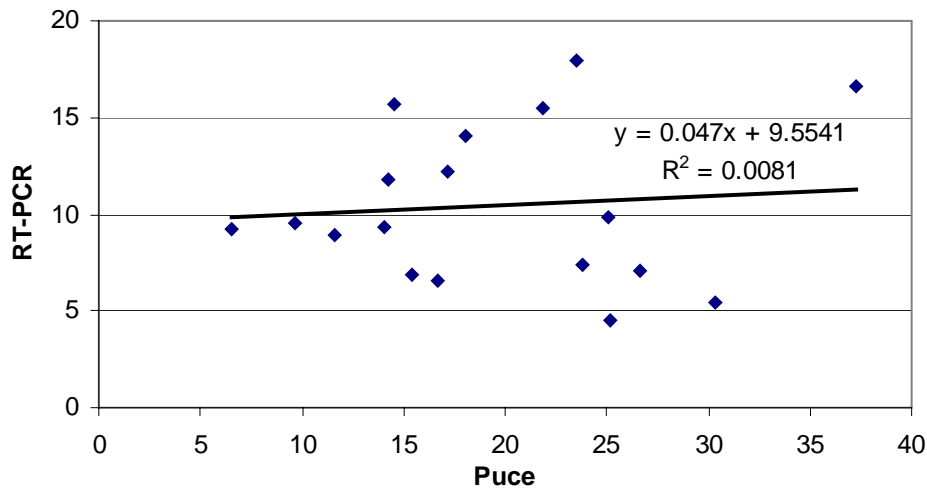


Figure 55 : Corrélation entre l'expression de PXR par puce d'expression (exprimée par le ratio intensité Cy3/bruit de fond Cy3) et par RT-PCR en temps réel (exprimée en nombre de copies/5 ng d'ADNc) dans les PBMCs.

Il n'apparaît aucune corrélation entre les valeurs obtenues par les 2 techniques. Cela peut s'expliquer par les démarches différentes pour chaque méthode. En effet, pour la RT-PCR en temps réel nous présentons les valeurs en nombre de copies pour 5 ng d'ADNc. Tandis que pour les puces d'expression, c'est le ratio intensité en Cy3 sur bruit de fond en Cy3 qui est évalué. Ce ratio a plutôt un rôle d'évaluation qualitative et est dépendant de la bonne incorporation du fluorochrome Cy3 qui varie d'un échantillon à l'autre. De plus, les quantités d'ARNm amplifiés (ARNa) déposés ne sont pas constantes d'une puce à l'autre (1,8 à 8 µg d'ARNa) et rendent plus difficiles la comparaison des échantillons. Enfin, il faut souligner que l'effectif de sujets traités par puce est faible.

Sachant qu'une corrélation entre l'expression de l'ARNm du transporteur ABCB1 et l'expression de l'ARNm du facteur de transcription PXR dans des PBMCs avait été rapportée précédemment par quelques auteurs sur un faible nombre de sujets, notre objectif était d'étudier l'expression de l'ARNm du transporteur ABCB1 et de l'ARNm de PXR dans des PBMCs de sujets sains.

→ Nous montrons que les ARNm d'ABCB1 et de PXR sont exprimés de façon constitutive dans les PBMCs de tous les sujets étudiés. Cependant, l'expression de PXR est faible.

→ De plus, ces expressions sont soumises à certaines variabilités interindividuelles. En effet :

1) L'expression d'ABCB1 est modulée positivement par l'IMC et par l'âge (non significatif après ajustement sur l'IMC). De plus, chez les femmes le taux de lymphocytes est corrélé à cette expression,

2) Par contre, les polymorphismes d'*ABCB1* n'ont pas d'effet sur son expression,

3) L'expression de PXR est significativement supérieure chez les hommes. Une corrélation significative avec les GGT est également observée en corrélations simples mais disparaît après prise en considération de l'effet du sexe.

→ Nous ne montrons aucune association entre l'expression de l'ARNm d'ABCB1 et de PXR dans les PBMCs. Cela pourrait s'expliquer par une variabilité interindividuelle importante et par une inconstance de l'expression de PXR dans les PBMCs. Cependant, il faut souligner qu'ABCB1 est exprimé environ 20 fois plus que PXR ce qui pourrait masquer cette corrélation. D'autre part, d'autres auteurs ont montré une expression de PXR élevée dans les PBMCs et il serait intéressant de mesurer de nouveau l'expression de PXR dans les PBMCs par une autre méthode que celle utilisée dans ce travail.

Ces travaux font l'objet d'une rédaction en vue de publication (ARTICLE N°4).

→ Enfin, nous n'observons pas de corrélations entre l'expression de l'ARNm de PXR par RT-PCR quantitative et par puce à ADNc. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat négatif : la différence de méthodologie, le faible nombre de sujets étudiés par les 2 techniques et enfin le caractère essentiellement qualitatif de la puce d'ADNc.

C. Etude des corrélations entre expressions d'ABCB1 et PXR dans les PBMCs et taux de lipides plasmatiques

L'analyse génétique effectuée dans la première partie de ce travail nous a permis de mettre en évidence des associations significatives entre génotypes d'*ABCB1* et taux d'ApoA1, de lipides ou d'apolipoprotéines. Nous venons de montrer qu'*ABCB1* et PXR sont exprimés constitutivement dans les PBMCs des sujets sains. Notre dernier objectif était donc d'évaluer si l'expression du transporteur *ABCB1* ; et de PXR ; dans les PBMCs était également associée à une modulation des taux plasmatiques de certains lipides/apolipoprotéines.

1) Corrélations simples

Les corrélations simples observées entre l'expression d'*ABCB1* et de PXR chez les sujets de la cohorte STANISLAS et les données du bilan lipidique au point 3 sont présentées dans le Tableau XLIX. A noter, au point 3 du recrutement de la cohorte STANISLAS, il n'a pas été procédé au dosage de l'ApoE et de l'ApoC3, nous n'avons donc pas pu étudier ces variables comme nous l'avons fait lors de l'analyse génétique.

Tableau XLIX : Corrélations ($p < 0,10$) entre différentes variables biologiques et l'expression de l'ARNm d'*ABCB1* et de PXR dans les PBMCs (Test de Pearson).

	ABCB1						PXR					
	Population totale (n=81)		Hommes (n=42)		Femmes (n=39)		Population totale (n=80)		Hommes (n=41)		Femmes (n=39)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Triglycérides	0,215	0,054										
Cholestérol												
HDL			-0,28	0,070								
LDL												
APOB												

r : coefficient de corrélation de Pearson, p = probabilité associée.

L'analyse des corrélations simples fait apparaître une corrélation positive non significative entre l'expression d'*ABCB1* et le taux de triglycérides dans la population totale ($r=0,215$; $p=0,054$) (Figure 56). Elle fait également apparaître une corrélation négative non significative entre l'expression d'*ABCB1* et le taux de HDL chez les hommes ($r=-0,28$; $p=0,07$) (Figure 57).

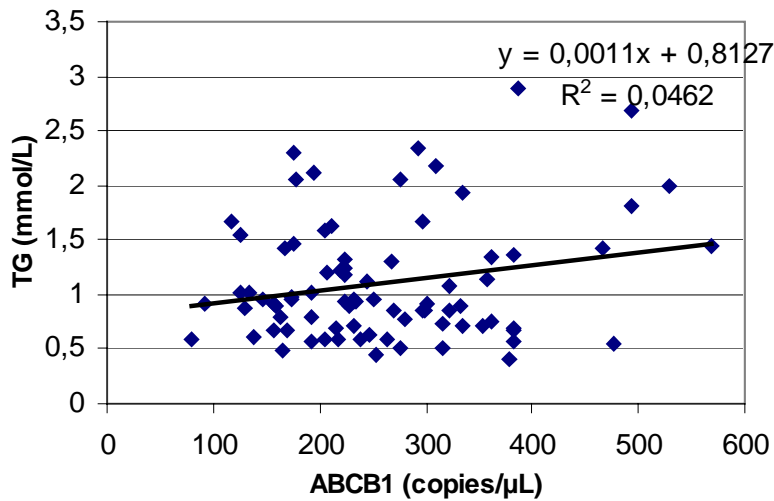


Figure 56 : Corrélation expression ABCB1 & taux de Triglycérides dans la population totale.

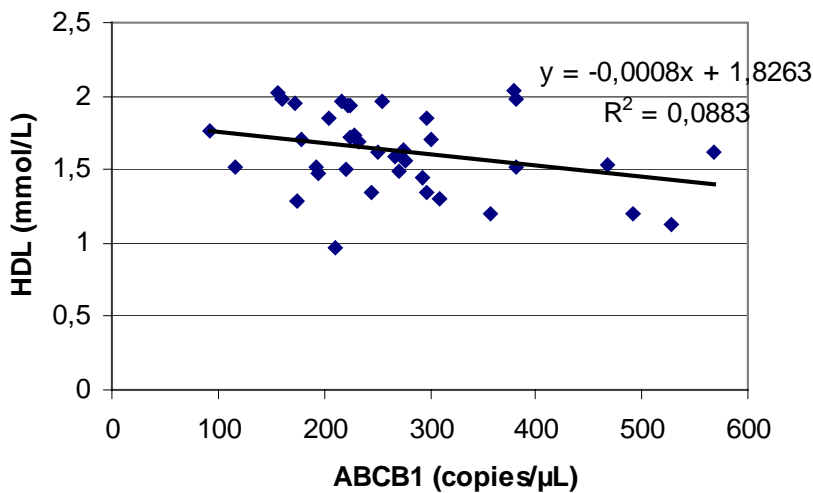


Figure 57 : Corrélation expression ABCB1 & taux de HDL chez les hommes.

2) Régressions multiples

Afin d'aller plus loin dans cette analyse, nous avons réalisé des régressions multiples en incluant comme variables explicatives du taux de lipides plasmatiques les données suivantes :

- expression d'ABCB1 et de PXR,
- âge, IMC, sexe,
- médicaments pouvant moduler l'expression d'ABCB1,
- médicaments hypolipémiants,
- contraceptifs oraux, traitement hormonal substitutif,
- taux de globules blancs (en Log), taux de lymphocytes (en Log).

Après régression multiple, aucun paramètre lipidique n'est associé ni à l'expression d'ABCB1 ni à celle de PXR (Tableau L). Les facteurs influençant les taux plasmatiques de lipides et/ou d'apolipoprotéines sont limités à l'IMC, au traitement hypolipémiant ou à la prise de contraceptifs. De même, si l'on divise l'effectif en fonction du sexe, l'expression d'ABCB1 n'influence aucun paramètre lipidique (résultats non présentés).

Tableau L : Corrélations entre taux de lipides plasmatiques et différentes variables après analyse de régression multiple ($p < 0,10$).

		Population totale (n=80)		
	Variable indépendante	$\beta \pm SE$	r^2 partiel	p
Cholestérol	Intercept	5,85±0,09	-	-
	CO	-0,95±0,30	0,12	0,002
HDL	Intercept	2,92±0,27	-	-
	IMC	-0,04±0,01	0,17	<0,001
	CO	-0,26±0,14	0,035	0,07
LDL	Intercept	3,52±0,09	-	-
	CO	-0,56±0,28	0,049	0,049
TG	Intercept	-0,63±0,33	-	-
	IMC	0,07±0,01	0,28	<0,0001
	CO	-0,30±0,17	0,03	0,09
ApoA1	Intercept	1,98±0,15	-	-
	hypolipémiants	0,23±0,10	0,06	0,028
	IMC	-0,01±0,01	0,06	0,03
ApoB	Intercept	0,79±0,12	-	-
	CO	-0,14±0,06	0,06	0,026
	IMC	0,01±0,005	0,05	0,041
ApoA1	Intercept	1,98±0,15	-	-
	hypolipémiants	0,23±0,10	0,06	0,028
	IMC	-0,01±0,01	0,06	0,03

3) Discussion

Dans ce travail, l'analyse de corrélation simple fait apparaître que l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs tend à être liée positivement au taux de triglycérides dans la population totale ($p=0,054$) et négativement au taux de HDL chez les hommes ($p=0,070$). Ceci est cohérent avec l'analyse génomique effectuée dans la cohorte STANISLAS où nous montrions que les allèles mutés, associés à une diminution de l'expression d'ABCB1 d'après la littérature, étaient pour certains associés à une diminution des taux de triglycérides et pour d'autres, à

une augmentation des taux d'ApoA1. Cependant, après prise en compte des autres facteurs influençant la variabilité des lipides, aucune association ne persiste entre l'expression de l'ARNm d'ABCB1 ; ou de PXR ; dans les PBMCs et le taux de lipides plasmatiques chez 83 sujets sains de la cohorte STANISLAS.

(a) Expression d'ABCB1 dans les PBMCs et lipides

A notre connaissance, aucune étude n'avait été menée jusqu'alors pour étudier les associations entre expression du transporteur ABCB1 dans les PBMCs et taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques. Certains auteurs se sont intéressés à la modulation de l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs par la concentration en cholestérol intracellulaire [126, 238]. Cependant, leur démarche va dans le sens inverse de la notre puisqu'elle vise à déterminer l'effet du cholestérol sur l'expression d'ABCB1 et non l'effet de l'expression d'ABCB1 sur l'homéostasie des lipides.

Il a été montré in vitro et ex vivo que le cholestérol module l'activité d'ABCB1 dans les PBMCs. Ainsi, Troost et ses collaborateurs [126] ont montré qu'une augmentation des taux cellulaires en cholestérol est significativement associée à une augmentation de l'activité d'ABCB1 dans les lymphocytes et dans les monocytes fraîchement isolés tandis qu'il n'y a pas d'effet de la déplétion.

Afin d'évaluer si cette modulation existe également in vivo, Storch et al., [238] ont évalué si les différences interindividuelles des taux de LDL plasmatiques chez l'homme avaient un impact sur le taux de cholestérol intracellulaire dans les PBMCs et sur l'activité d'ABCB1 dans ces PBMCs. Leur effectif était composé de 20 sujets présentant des taux élevés de LDL (non traités par hypolipémiants) et de 28 contrôles, la prise de médicaments inducteurs d'ABCB1 étant un critère d'exclusion. Les observations faites par ces auteurs vont dans le sens de nos résultats. En effet, Storch et al., ne montrent ex vivo aucun effet des différences inter individuelles en LDL cholestérol plasmatiques sur la concentration en cholestérol dans les PBMCs ou sur l'expression et l'activité d'ABCB1 dans ces cellules [238]. Ils ne mettent en évidence ni différence d'expression ou d'activité d'ABCB1, ni de différence de concentration en cholestérol cellulaire entre les 2 groupes. En considérant l'ensemble de la population, ces auteurs ne montrent également ni corrélation entre la concentration en LDL plasmatique et la concentration en cholestérol des PBMCs, ni corrélation entre l'activité

d'ABCB1 et le taux de LDL ou de cholestérol cellulaire. Les auteurs ne présentent pas les résultats de ces corrélations avec l'expression de l'ARNm d'ABCB1 [238].

En accord avec nos observations, ces auteurs ne montrent également aucun effet du génotype pour C3435T, G2677T ou l'haplotype correspondant, sur l'expression ou l'activité d'ABCB1 dans les 2 sous-groupes comme dans la population totale. A noter, la seule association significative dans le travail de Storch et al., est une corrélation négative significative entre l'âge et l'activité d'ABCB1 (40-80 ans) ($p=0,035$).

***(b) Profil transcriptomique des PBMCs en
physiopathologie cardiovasculaire : intérêt du modèle?***

Pour l'étude du transcriptome associé au métabolisme lipidique, quelques auteurs se sont déjà servis avec succès du modèle PBMC. Par exemple, Wibaut-Berlaimont et al., ont montré à l'aide d'une puce d'expression que l'atorvastatine régule l'expression de gènes associés à l'hémostase, l'inflammation et l'apoptose dans les PBMCs de 11 sujets hyperlipémiques avant même qu'un changement du profil lipidique soit visible dans le sang [176]. De même, Ma et al., [177] ont récemment étudié à l'aide d'une puce le profil d'expression de nombreux gènes dans les PBMCs de 32 sujets sains en rapport avec les concentrations en lipides plasmatiques. Ils mettent en évidence différents profils intéressants qui suggèrent que les leucocytes répondent aux changements de concentrations en lipides plasmatiques en régulant certains groupes de gènes dont les gènes impliqués dans la réponse immunitaire et dans le métabolisme des lipides et des acides gras. Ils montrent ainsi que :

- l'expression de nombreux gènes liés à l'inflammation et à la réponse immunitaire sont associés au taux de lipides plasmatiques,
- l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et dans la chaîne de transport d'électron est positivement corrélée avec le taux de triglycérides et de LDL et négativement avec les HDL,
- l'expression des gènes impliqués dans l'agrégation plaquettaire sont négativement corrélés avec les taux de HDL,
- l'expression des facteurs de transcription régulant les gènes impliqués dans la lipogenèse est corrélée avec les taux de lipides plasmatiques,
- enfin, de nombreux gènes associés aux taux de lipides plasmatiques sont localisés dans des régions (quantitative trait loci) connues pour être associées à l'hyperlipémie.

Selon certains auteurs, l'expression de l'ARNm d'ABCB1 serait liée à la fonctionnalité du transporteur dans les PBMCs et la régulation de l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs serait également conservée. Ainsi, l'expression dans les PBMCs répond à des facteurs connus comme inducteurs de l'expression d'ABCB1 dans d'autres tissus tels que la rifampicine [162]. L'étude du niveau d'expression d'ABCB1 dans les PBMCs est d'intérêt majeur pour optimiser l'efficacité et la sûreté des médicaments agissant principalement au niveau de ces cellules tels que des antirétroviraux ou des agents anticancéreux et transportés par ce transporteur [113, 230]. Il a également été montré que l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs est significativement corrélée à la modulation des lipides en réponse au traitement par statine ainsi qu'au risque d'effets indésirables dus à cette classe pharmacologique [244]. L'atorvastatine, substrat efflué hors des cellules par ABCB1, inhiberait l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs [244] augmentant ainsi son efficacité. Ainsi, Rodrigues et al., [244] ont montré que l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs de sujets hyperlipémiques est corrélée positivement avec l'activité de la créatine kinase (témoin de rhabdomyolyse) et négativement avec la réduction du cholestérol total après traitement. Bien que le PBMC ne soit pas considéré comme le lieu majeur d'activité des statines, il est donc représentatif de l'effet au niveau de l'organisme.

D'un autre côté, l'expression du transporteur ABCB1 n'est pas régulée de façon homogène entre organes et l'influence des xénobiotiques et de l'alimentation, à laquelle sont exposés différemment les tissus, provoquent des différences d'expression de ce transporteur rendant impossible l'utilisation d'un tissu comme substitut d'un autre tissu. En particulier, les PBMCs, d'intérêt certain car facilement accessibles, ne pourrait pas servir de substitut à l'intestin et au foie ; organes clés de l'absorption et du métabolisme ; ou à la barrière hémato-encéphalique pour l'étude de l'expression ou de l'activité d'ABCB1 [113, 230, 238]. Les résultats de notre travail ne clarifient donc pas si les taux de lipides plasmatiques pourraient être corrélés à l'expression d'ABCB1 et à sa fonction dans d'autres organes. Une étude sur les associations entre taux de lipides plasmatiques et expression d'ABCB1 dans d'autres tissus pourrait donner d'autres résultats. En effet, il a été proposé qu'ABCB1 ait un rôle dans la régulation du cholestérol au niveau de l'intestin par exemple. Ainsi, Tessner et al., [141], ont montré *in vitro* que le taux d'expression d'ABCB1 dans des cellules intestinales peut influencer le taux de cholestérol absorbé via ces cellules. En effet, des cellules épithéliales d'intestin murin transfectées pour le gène *MDR1* humain présentent une augmentation de l'expression de la protéine ABCB1 et une augmentation de l'import de cholestérol par rapport

aux cellules non transfectées. De plus, malgré une synthèse de cholestérol normale, les souris déficientes en *mdr1a* et *mdr1b* (équivalent d'ABCB1 chez l'homme) ont des concentrations plasmatiques en cholestérol plus faibles associées à une augmentation de la perte fécale de cholestérol, suggérant un rôle important d'ABCB1 dans la réabsorption intestinale du cholestérol [142-144].

Il se pourrait que les PBMCs ne soient pas un bon modèle d'étude du transporteur ABCB1 en physiopathologie cardiovasculaire, ou que le rôle du transporteur ABCB1 soit mineur dans l'homéostasie des lipides, bien que nous ayons observé des associations intéressantes entre ses polymorphismes et les taux de lipides plasmatiques. Il est également possible que la puissance de notre étude soit insuffisante pour dégager une telle association. Il est toutefois difficile de trancher quant à la pertinence de l'association entre expression d'ABCB1 dans les PBMCs et taux de lipides en ayant travaillé exclusivement chez le sujet sain. Il faudrait reproduire ce travail dans une population de sujets malades, les anomalies du bilan lipidique pouvant être une condition de la stimulation de l'activité d'ABCB1 dans les PBMCs. L'isolement des PBMCs n'a pas été prévu dans l'étude HYDROGENE. Nous ne pouvions donc réaliser d'analyse transcriptomique chez ces patients. Une autre possibilité serait d'utiliser un modèle cellulaire de PBMCs chez qui l'expression d'ABCB1 pourrait être induite.

Nous avons montré dans la première partie de notre travail que les polymorphismes d'ABCB1 peuvent moduler les taux plasmatiques de certains lipides/apolipoprotéines chez le sujet sain comme chez le sujet à risque cardiovasculaire élevé. Nous avons ensuite observé que les ARNm d'ABCB1 et de PXR sont exprimés dans les PBMCs, un tissu semblant d'intérêt en physiopathologie cardiovasculaire d'après la revue de la littérature. Notre objectif suivant était donc d'évaluer si l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs est également associée à une modulation des taux plasmatiques de certains lipides/apolipoprotéines. Il apparaît que :

1) l'analyse des corrélations simples tend à montrer l'existence d'une corrélation entre l'expression d'ABCB1 et le taux de triglycérides dans la population totale ($r=0,215$; $p=0,054$) et entre l'expression d'ABCB1 et le taux de HDL chez les hommes ($r=-0,28$; $p=0,07$).

2) après prise en compte des autres facteurs agissant sur la variabilité des taux de lipides plasmatiques (IMC, ...), nous ne montrons aucune association significative entre l'expression d'ABCB1 ; ou de PXR ; dans les PBMCs et le taux de lipides plasmatiques.

→ Plusieurs hypothèses émergent :

1) soit nous manquons de puissance. Il serait intéressant de reproduire ce travail chez un plus grand nombre de sujets,

2) soit le rôle du transporteur ABCB1 est mineur dans l'homéostasie des lipides chez le sujet sain, bien que nous ayons observé des associations intéressantes entre ses polymorphismes et les taux de lipides plasmatiques,

3). soit les PBMCs de sujets sains ne sont pas un bon modèle d'étude des associations transporteur ABCB1-taux de lipides plasmatiques.

→ Il est toutefois difficile de trancher quant à la pertinence de l'association entre expression d'ABCB1 dans les PBMCs et taux de lipides en ayant travaillé exclusivement chez le sujet sain. Il faudrait reproduire ce travail dans des conditions d'induction du transporteur ABCB1 dans une population de sujets malades par exemple, ou en utilisant un modèle ex vitro ou in vitro.

Ces travaux font l'objet d'une rédaction en vue de publication (*résumé ARTICLE N°4*).

IV. Polymorphismes D'ABCB1 et d'autres gènes impliqués en physiopathologie cardiovasculaire dans 7 lignées cellulaires continues (ARTICLE N°5)

Ne disposant pas de population malade chez laquelle réaliser une analyse transcriptomique, nous nous sommes intéressés aux modèles in vitro afin d'orienter les perspectives de ce travail.

Il existe trois types de modèles cellulaires qui s'éloignent progressivement des caractéristiques des cellules normales in vivo pour se rapprocher de conditions simplifiées d'expérimentation : la culture d'organe, les cellules en culture primaire et les lignées cellulaires [260]. Cette approche in vitro, complémentaire de l'approche in vivo, est souvent indispensable pour aborder de nombreux domaines d'intérêt en biologie. Le choix du modèle le plus approprié est fonction de la question biologique posée, des contraintes expérimentales et plus prosaïquement, des modèles déjà disponibles ou qui peuvent être créés. Il serait possible de mettre en culture des PBMCs fraîchement du sang de patients afin de les soumettre à certains modulateurs de l'expression d'ABCB1 comme l'ont fait certains auteurs avec le LPS par exemple [233]. Cependant, ce sont les lignées cellulaires immortalisées dites « continues » qui constituent le modèle le plus maniable pour le biologiste. Il existe de nombreuses lignées immortalisées de cellules hématopoïétiques qui gardent la majorité des phénotypes de la cellule d'origine, et sont fréquemment utilisées en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardiovasculaires. Ces lignées permettent d'étudier des mécanismes moléculaires et des voies de signalisation tels que la différenciation des monocytes en macrophages grâce à la lignée Thp1 [261] mais également les mécanismes de biotransformation des xénobiotiques [262] et leur toxicité. Par exemple, la lignée U937 a été utilisée dans l'étude des mécanismes de la réponse inflammatoire des macrophages à la pollution [263] ou encore la lignée K562 dans la régulation des enzymes du métabolisme des médicaments et des transporteurs [264].

Nous nous sommes intéressés à 4 lignées continues de cellules mononuclées sanguines humaines : Thp1, U937, HL60 et K562. La lignée monocyttaire Thp1 a été obtenue à partir du sang d'un patient porteur d'une leucémie monocyttaire aiguë [265]. En culture, ces cellules en suspension sont individualisées ou poussent parfois sous la forme d'agrégats. Elles sont

généralement utilisées sous leur forme différenciée, en macrophages ou en cellules spumeuses, comme modèles d'étude de l'athérosclérose. En effet, après induction par les esters de phorbol (Phorbol 12-myristate 13-acetate ou PMA) les cellules deviennent adhérentes et présentent en quelques jours des propriétés macrophagiques. Ensuite, l'addition de LDL acétylés ou oxydés les différencie en cellules spumeuses. Cette lignée a servi, par exemple, à l'étude de la régulation de l'expression d'un ensemble de protéines afin de proposer de nouveaux biomarqueurs candidats de l'athérosclérose [266]. La lignée leucémique U937 est dérivée du prélèvement pleural d'un patient caucasien présentant un lymphome histiocytaire généralisé [267]. Les cellules sont individualisées et sont sphériques à polygonales. Comme Thp1, ces cellules promonocytaires sont utilisées pour former un modèle de macrophages après induction par du PMA ou de cellules spumeuses par addition de LDL acétylés ou oxydés. Les cellules HL60 sont issues du sang périphérique d'une femme caucasienne présentant une leucémie aiguë promyéloblastique [268]. Ces cellules présentent une morphologie de promyélocytes neutrophiliques et sont sphériques et individualisées. Elles peuvent être soit différenciées en neutrophiles matures soit en macrophages. Ces cellules présentent spontanément des activités de phagocytose et répondent aux stimuli chimiotactiques. Cette lignée permet notamment l'étude des événements moléculaires liés à la différenciation myéloïde et l'étude des effets des éléments physiologiques, pharmacologiques et virologiques sur ce processus. Enfin, la lignée K562 a été obtenue à partir d'une patiente porteuse d'une leucémie myéloïde chronique. Elle présente, de façon non constante, le chromosome de Philadelphie [269]. Ces cellules en suspension peuvent être induites à se différencier vers les lignées érythroïde, granulocytaire ou monocyttaire suivant la nature de l'inducteur [270]. Cette lignée est également très utilisée comme cellule tumorale cible *in vitro* dans les essais de détermination de l'activité cytotoxique des cellules *natural killer*.

Nous avons génotypé ces 4 lignées Thp1, U937, HL60 et K562 pour les polymorphismes d'*ABCB1*, *ABCA1* et *ABCG8* étudiés dans ce travail ainsi que pour un ensemble de polymorphismes de gènes liés au système cardiovasculaire. Nous nous sommes intéressés également à 2 lignées hépatiques (HepG2 et Kyn2) et à une lignée intestinale (Caco2).

Il est apparu que ces lignées étaient porteuses de polymorphismes dans les gènes codant les transporteurs ABC (Tableau LI) ainsi que dans de nombreux autres gènes associés au métabolisme des lipides. Ainsi, les lignées monocytaires Thp1 et U937 sont homozygotes mutées pour *ABCB1* C1236T, G2677T et C3435T. Les lignées d'origine leucémique K562 et HL60 sont porteuses respectivement des génotypes -1AA, -76AA et 3435TT ; et 61AG,

1236CT, -76TA, 2677TA et 3435CT. Ces polymorphismes peuvent influencer l'expression d'ABCB1. Les profils génétiques obtenus devraient donc être considérés avec attention lors du choix d'un modèle in vitro pour l'étude éventuelle des associations entre lipides et expression induite d'ABCB1.

Tableau LI : Génotypes de 7 lignées cellulaires pour 3 transporteurs ABC.

	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
<i>ABCB1</i> T-129c	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
<i>ABCB1</i> G1199a	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
<i>ABCB1</i> C1236t	tt	tt	Ct	CC	CC	tt	Ct
<i>ABCB1</i> G2677t/a	tt	tt	ta	GG	GG	GG	Gw ^a
<i>ABCB1</i> C3435t	tt	tt	Ct	tt	CC	Ct	Ct
<i>ABCB1</i> ASP21asn	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/asn	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP
<i>ABCB1</i> T-76a	TT	TT	Ta	aa	Ta	TT	Ta
<i>ABCB1</i> G-1a	GG	GG	GG	aa	GG	GG	GG
<i>ABCA1</i> ARG219lys	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/lys	ARG/ARG	ARG/ARG
<i>ABCA1</i> ILE883met	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/met	ILE/ILE	ILE/ILE
<i>ABCA1</i> LYS1587arg	Arg/arg	Arg/arg	Arg/arg	Arg/arg	Arg/arg	Arg/arg	Arg/arg
<i>ABCA1</i> C-7t	CC	CC	Ct	tt	ND	CC	CC
<i>ABCA1</i> G-395c	GG	Gc	Gc	cc	cc	GG	Gc
<i>ABCA1</i> C-564t	ND	Ct	Ct	tt	tt	CC	Ct
<i>ABCG8</i> THR400lys	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	lys/lys
<i>ABCG8</i> TYR54cys	cys/cys	cys/cys	TYR/cys	cys/cys	TYR/cys	TYR/cys	TYR/TYR
<i>ABCG8</i> ALA632val	ALA/ALA	ALA/ALA	ALA/ALA	ALA/ALA	ALA/val	ALA/ALA	ALA/ALA

^a w = t ou a ; ND = Non déterminé

L'établissement des profils génétiques des lignées Thp1, U937, HL60, K562, HepG2, Kyn2 et Caco2 pour un certain nombre de polymorphismes de gènes impliqués dans l'initiation ou le développement des maladies cardiovasculaires et dans la réponse au traitement de ces pathologies, dont *ABCB1*, apporte de nombreuses informations d'intérêt. Ces cellules forment des modèles in vitro intéressants en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardiovasculaire. La connaissance de leurs profils génétiques constitue une information utile au chercheur lors du choix d'une lignée pour un travail donné ou lors de l'interprétation des résultats observés dans ces modèles in vitro. Nous avons donc réalisé une publication à partir de ce travail soumis à *Cell Biology and Toxicology* (**ARTICLE N°5**).

Nous souhaitons dans une dernière partie ouvrir les perspectives de notre travail concernant l'utilisation possible d'un modèle cellulaire pour étudier les associations entre lipides et expression d'ABCB1 dans des PBMCs soumis à induction du transporteur. Nous avons donc génotypé 7 lignées cellulaires pour les polymorphismes d'*ABCB1* et d'autres gènes d'intérêt en physiopathologie cardiovasculaire.

→ Nous montrons que ces lignées sont porteuses de nombreux polymorphismes de gènes d'intérêt en physiopathologie cardiovasculaire. Concernant le gène *ABCB1* :

1) les lignées monocytaires Thp1 et U937 sont homozygotes mutées pour *ABCB1* C1236T, G2677T et C3435T. Les lignées d'origine leucémique K562 et HL60 sont porteuses respectivement des génotypes -1AA, -76AA et 3435TT ; et 61AG, 1236CT, -76TA, 2677TA et 3435CT,

2) les lignées hépatiques HepG2 et Kyn2 sont porteuses d'au moins un allèle muté respectivement pour T-76A ; et pour C1236T et C3435T,

3) la lignée intestinale Caco2 est hétérozygote pour C1236T, T-76A, G2677W et C3435T.

→ Les profils génétiques obtenus devraient être considérés avec attention lors du choix d'un modèle in vitro pour l'étude éventuelle des associations entre lipides et expression induite d'ABCB1.

Ces travaux de profilage génétique de lignées cellulaires ont fait l'objet d'un article soumis pour publication à *Cell Biology and Toxicology* (**ARTICLE N°5**).

CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

ABCB1 est un transporteur ubiquitaire exprimé notamment au niveau des différentes barrières pharmacologiques de l'organisme. ABCB1 s'est révélé central dans le domaine de la pharmacorésistance à de nombreux traitements. ABCB1 peut également transporter certains substrats physiologiques lipophiles. Cependant, l'importance de ce transporteur sur le plan physiologique reste méconnu. Il a été montré que d'autres transporteurs ABC sont d'importance majeure dans le contrôle de l'homéostasie des lipides tels ABCA1 et ABCG5/G8. La revue de la littérature nous a amené à supposer, qu'en plus de son importance dans les phénomènes de chimiorésistance, le transporteur ABCB1 pourrait intervenir dans l'homéostasie des lipides. L'implication d'ABCB1 dans le transport du cholestérol est controversée car limitée essentiellement à des études *in vitro*. Nous manquons d'informations sur ce rôle dans l'absorption, la distribution ou le métabolisme du cholestérol *in vivo* [122]. Cependant, de nombreux points supportent l'hypothèse selon laquelle l'un des rôles physiologiques d'ABCB1 est le transport du cholestérol. Premièrement, comme une grande partie des transporteurs ABC, ABCB1 est un gène répondant au cholestérol. Deuxièmement, ABCB1 serait exprimé dans des microdomaines membranaires particulièrement riches en cholestérol [126]. Troisièmement, des expériences *in vitro* et *ex vivo* ont montré qu'ABCB1 pourrait faciliter la redistribution du cholestérol libre de la couche interne vers la couche externe de la bicouche lipidique [128] ou vers le reticulum endoplasmique [132] facilitant ainsi son estérification [133]. Enfin, ABCB1 pourrait réguler la réabsorption intestinale du cholestérol et la susceptibilité à l'athérosclérose [139, 144]. Nous avons donc choisi de mener une analyse génomique et transcriptomique d'ABCB1 en relation avec le bilan lipidique plasmatique afin de proposer ABCB1 comme éventuel nouveau biomarqueur du risque cardiovasculaire.

L'identification d'un biomarqueur peut se faire dans une population de sujets supposés sains qui permet d'avoir une bonne homogénéité de population et d'éviter des interférences liées à de multiples facteurs de risque, pathologies ou traitements médicamenteux. Cette étape de travail chez le sujet sain permet également d'étudier la variabilité interindividuelle du biomarqueur potentiel. La validation peut ensuite se faire dans une population pathologique ou à risque cardiovasculaire élevé. Nous avons à notre disposition deux populations nous

permettant d'aborder ce travail : la cohorte familiale de sujets sains STANISLAS et les cas hypertendus-diabétiques et les témoins de l'étude HYDROGENE.

Quelques polymorphismes d'*ABCB1* ont été associés à des modulations de la pharmacocinétique de médicaments substrats de ce transporteur, à des modifications de la réponse à certains traitements, ou à la susceptibilité à des pathologies [31, 70]. Nous avons donc choisi d'évaluer si les polymorphismes d'*ABCB1* peuvent influencer les taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques.

La fréquence des variants et des haplotypes d'*ABCB1* peut varier en fonction de l'ethnie [77]. Dans la première étape de notre travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés à déterminer la fréquence dans notre échantillon de sujets sains de 8 polymorphismes d'*ABCB1*, dont nous avons souligné l'intérêt dans l'introduction, et des haplotypes formés par ces polymorphismes. Nous avons montré que les fréquences des allèles mutés dans l'échantillon de la cohorte STANISLAS étudié sont respectivement de 0,04 ; 0,08 ; 0,09 ; 0,06 ; 0,41 ; 0,46 ; 0,44 et 0,46 pour les polymorphismes T-129C, G-1A, A61G, G1199A, C1236T, T-76A, G2677W et C3435T. Ces fréquences sont similaires à celles observées dans d'autres populations européennes excepté pour C3435T [188]. Enfin, ces polymorphismes sont en fort déséquilibre de liaison et un certain nombre d'haplotypes peut être défini.

La littérature a montré l'existence d'associations significatives entre certains polymorphismes d'*ABCB1* et la modulation de l'effet de nombreux médicaments dont la baisse du cholestérol sous statines et l'hypercholestérolémie secondaire aux antirétroviraux [72]. Des études récentes proposent qu'en plus de moduler la pharmacocinétique des statines et des antirétroviraux, les polymorphismes d'*ABCB1* pourraient expliquer une partie de l'efficacité ou des effets indésirables de ces molécules par un impact direct sur les taux de lipides indépendamment de la présence de ces médicaments [90, 92, 121]. Nous avons donc corrélé les génotypes d'*ABCB1* et les taux de lipides plasmatiques chez les sujets sains génotypés. Nous sommes les premiers à montrer par ce travail que les variants d'*ABCB1* peuvent moduler, de façon sexe-dépendante, les concentrations plasmatiques en lipides et apolipoprotéines chez le sujet sain. La présence d'un allèle muté en position 3435, 1236, 2677 et la présence de l'allèle sauvage en position -76 et -1 sont associés avec un profil anti-athérogène. En effet, l'allèle 3435T est associé à un taux d'ApoA1 plasmatique plus élevé que l'allèle sauvage. De plus, l'allèle sauvage T-76 et l'allèle muté 1236T sont associés à une diminution des taux de molécules pro-athérogènes, c'est à dire cholestérol total, LDL, ApoB, TG et/ou ApoC3 chez les femmes exclusivement (tendance pour 2677W et G-1). Bien que ces

polymorphismes soient en fort déséquilibre de liaison, l'analyse haplotypique n'est pas plus informative que l'analyse individuelle de ces polymorphismes, excepté pour le taux d'ApoA1. Dans notre étude sur des sujets sains, les résultats diffèrent de ce qu'observent Kajinami et al., et Rodrigues et al., [92, 121] chez des individus hyperlipémiques avant traitement hypolipémiant. En effet, ils observent des taux plus élevés de LDL et de cholestérol total chez les porteurs de l'haplotype 2677T-3435T. Les explications peuvent être des différences de taille des échantillons ainsi que leur composition : sujets sains versus hyperlipémiques. En effet, la concentration en lipides, notamment en cholestérol, peut moduler l'activité du transporteur ABCB1 [126]. La diminution de l'expression d'ABCB1 associée à certains variants, tel que 3435T [71], pourrait résulter en une diminution du contenu intracellulaire en esters de cholestérol qui induirait une augmentation de la synthèse du cholestérol endogène et de la capture des LDL, médiés respectivement par l'HMCoA Réductase et le récepteur aux LDL, et diminuerait le taux de cholestérol plasmatique. De plus, la modification de la disponibilité du cholestérol estérifié pourrait moduler la biodisponibilité du cholestérol libre pour son efflux hors de la cellule via ABCA1 [128].

Il est connu que certains polymorphismes d'autres transporteurs de la superfamille des ABC ont un effet sur les taux de lipides et de lipoprotéines plasmatiques [36-38]. Ainsi, quelques polymorphismes d'*ABCA1* ont été associés aux taux de HDL et d'ApoA1 et des polymorphismes d'*ABCG5/G8* aux taux de cholestérol, de LDL ou d'ApoB en interaction avec l'alimentation. Afin d'évaluer par la suite le potentiel d'*ABCB1* comme nouveau marqueur génétique du risque cardiovasculaire, nous avons donc testé dans notre échantillon les associations, connues d'après la littérature, entre taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques et quelques polymorphismes majeurs de ces 2 transporteurs.

Contrairement à ce qui a été précédemment décrit, nous ne mettons en évidence ni association entre génotypes d'*ABCA1* et taux d'HDL ou d'ApoA1, ni association entre polymorphismes d'*ABCG8* et taux de cholestérol ou de LDL. Parmi les explications possibles, citons un effectif peut-être faible ou un effet caché par la co-existence d'autres polymorphismes actifs. D'autre part, nous montrons l'existence d'associations significatives entre 4 polymorphismes d'*ABCA1* et les taux d'apolipoprotéine E et/ou C3, chez les femmes exclusivement. Ces associations avec les concentrations en molécules pro-athérogènes ont été peu décrites dans la littérature. Elles mériteraient une étude plus approfondie en tenant compte notamment des interactions gène-gène potentielles entre *ABCA1* et *APOE*. De plus, bien que nous ayons

séparé notre population en fonction du sexe, nous ne mettons en évidence aucune association entre les 3 polymorphismes d'*ABCG8* étudiés et les taux de lipides plasmatiques. Peut être serait-il intéressant d'intégrer des données de régimes alimentaires pour mettre en évidence certaines associations.

Grâce au caractère familial de notre population, nous souhaitons ensuite évaluer la part des polymorphismes d'*ABCB1*, mais également d'*ABCA1* et d'*ABCG8*, dans la modulation des taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines chez les sujets sains. Cependant, le polymorphisme C3435T d'*ABCB1* est le seul pour lequel nous observons une association à la fois chez les hommes et chez les femmes avec le taux d'ApoA1. De plus, aucun des polymorphismes d'*ABCA1* ou *G8* n'est associé à l'ApoA1. Enfin, toutes les associations observées avec ces polymorphismes sont limitées au sous-groupe femmes. Nous nous sommes donc exclusivement intéressés à déterminer la part du polymorphisme C3435T d'*ABCB1* dans la variabilité du taux d'ApoA1 plasmatique. Bien qu'une part de la variabilité du taux d'ApoA1 soit liée à la génétique, il apparaît que le polymorphisme C3435T d'*ABCB1* n'explique aucune part de cette variabilité génétique dans notre échantillon familial. Ceci pourrait être dû à un manque de puissance de notre effectif car nous ne disposons que de 86 hommes, 86 femmes, 58 garçons et 52 filles (soit 86 couples père/mère, 218 couples parent/enfant et 53 couples enfant/enfant).

Après avoir montré l'existence d'associations significatives entre polymorphismes d'*ABCB1* et taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines chez le sujet sain, nous souhaitons reproduire ce travail chez des sujets à risque cardiovasculaire plus élevé. Les témoins inclus dans l'étude HYDROGENE sont des sujets supposés sains, comme dans la cohorte STANISLAS, mais dont la moyenne d'âge est plus élevée donc qui ont à priori un risque plus élevé de développer des maladies cardiovasculaires. D'autre part, plus les sujets sont âgés, plus on suppose que l'environnement joue un rôle important dans la variabilité de phénotypes d'intérêt tels que les taux de lipides plasmatiques. Enfin, les cas inclus dans l'étude HYDROGENE sont des hypertendus-diabétiques formant une population à haut risque cardiovasculaire. L'objectif suivant était donc d'évaluer si les polymorphismes d'*ABCB1* influencent également les taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines chez les sujets de l'étude HYDROGENE.

Dans une première étape, nous nous sommes attachés à établir les fréquences génotypiques des polymorphismes d'*ABCB1* dans les groupes cas et témoins. Il apparaît que la fréquence des allèles mutés en position 1236 et 2677 chez les cas de l'étude HYDROGENE est plus élevée que chez les témoins mais ne varie pas significativement de la répartition dans la cohorte STANISLAS ($p < 0,06$ pour C1236T).

Puis nous avons mené dans cette étude HYDROGENE des études d'associations entre génotypes d'*ABCB1* et concentrations en lipides et lipoprotéines. Nous montrons qu'il existe des associations significatives, entre polymorphismes et taux plasmatiques de lipides et d'apolipoprotéines dans les groupes cas et témoins. De plus, ces associations tendent à aller dans un sens opposé de celles observées dans la cohorte STANISLAS. C'est à dire que lorsque la présence d'un allèle muté est plutôt associée à un phénotype pro-athérogène dans la cohorte STANISLAS, on observe une tendance inverse dans la population HYDROGENE chez les cas comme chez les témoins. Notamment, chez les cas, 1236T est associé avec une augmentation du taux d'ApoE et 3435T avec une diminution du taux de HDL. Chez les témoins, 1236T et 2677W sont associés à une augmentation du taux de triglycérides. De plus 3435T et -76A sont associés respectivement à une augmentation du taux d'ApoB et à une diminution des taux de cholestérol et d'ApoB. Enfin, l'effet sexe-dépendant n'est pas retrouvé chez les sujets de l'étude HYDROGENE.

Plusieurs points peuvent éclaircir ces disparités : 1) le faible effectif de la population HYDROGENE et le déséquilibre du ratio hommes/femmes entre cas et témoins, 2) le traitement par hypolipémiants d'un certain nombre de cas et la co-existence de nombreux autres traitements médicamenteux, ou 3) il pourrait également y avoir un biais lié à l'exclusion de l'étude HYDROGENE des cas et des témoins ayant une dyslipidémie non traitée (LDL cholestérol $> 1,60$ g/l ou triglycérides > 3 g/l). En effet, l'exclusion des individus avec des valeurs hautes pourrait avoir décapité la présence de certains génotypes d'*ABCB1* et diminué leur fréquence.

Afin de valider la signification des associations observées dans ce travail entre polymorphismes d'*ABCB1* et taux de lipides plasmatiques, il serait intéressant de reproduire ce travail dans une troisième étude qui comporterait plus d'individus, séparés en 2 groupes homogènes, l'un avec des valeurs lipidiques plasmatiques normales et l'autre avec des valeurs hautes mais ne prenant pas de médicaments.

Nous avons poursuivi notre travail d'analyse génomique par une analyse transcriptomique afin d'évaluer si l'expression de l'ARNm du transporteur ABCB1 pourrait être proposée comme biomarqueur du risque cardiovasculaire facilement mesurable à grande échelle.

Les PBMCs forment un tissu facilement accessible et donc aisément utilisable à grande échelle. Plusieurs auteurs se sont servis avec succès des PBMCs comme modèle d'étude de différents profils transcriptomiques associés au système cardiovasculaire. Ces cellules ont été isolées chez les individus de la cohorte STANISLAS lors du troisième point de recrutement de la cohorte. C'est donc le modèle tissulaire dont nous nous sommes servis pour ce travail.

Lors d'une étude du transcriptome, l'utilisation de puces permet de réaliser un screening rapide avant d'approfondir la démarche par RT-PCR. Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à évaluer par puces d'expression si les PBMCs pourraient être un tissu d'intérêt pour étudier l'expression d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de facteurs de transcription d'intérêt en physiopathologie cardiovasculaire. Grâce à l'utilisation de ces puces d'expression nous avons montré que la grande majorité des 16 enzymes de phase I et de phase II étudiées sont exprimées à l'état basal dans les PBMCs de 20 sujets supposés sains de la Cohorte STANISLAS. La grande majorité des 13 facteurs de transcription étudiés sont également exprimés à l'état constitutif. De plus, il existe des corrélations significatives entre l'expression de certains facteurs de transcription et CYP450 étudiés. Les PBMCs pourraient donc être de bons modèles pour étudier l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de facteurs de transcription considérés comme des marqueurs potentiels du risque cardiovasculaire.

ABCB1 n'a pas été étudié grâce à la puce d'expression précédemment décrite. Nous avons donc dans un deuxième temps étudié l'expression de ce transporteur par une technique de RT-PCR en temps réel dans les PBMCs de 83 sujets supposés sains de la cohorte STANISLAS. De plus, nous avons étudié l'expression de l'un des facteurs de transcription intervenant dans la régulation de l'expression d'ABCB1 : PXR. Ce facteur ayant été mesuré par la puce, cela nous a permis de faire une corrélation entre les 2 techniques.

Nous montrons par RT-PCR que les ARNm d'ABCB1 et de PXR sont exprimés de façon constitutive dans les PBMCs de tous les sujets étudiés. Cependant, l'expression de PXR est faible. De plus, nous n'observons pas de corrélation entre l'expression de l'ARNm de PXR par RT-PCR quantitative et par puce à ADNc. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat

négatif : la différence de méthodologie, le faible nombre de sujets étudiés simultanément par les 2 techniques (n=20) et enfin le caractère essentiellement qualitatif de la puce d'ADNc. Certains auteurs se sont intéressés à l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs. Cependant, les effectifs étudiés sont souvent deux fois plus faibles que le notre et ne concernent pas toujours des sujets sains. Nous avons évalué les facteurs de variabilité interindividuelle de l'expression d'ABCB1 et de PXR dans les PBMCs de 83 sujets supposés sains. Nous montrons que l'expression d'ABCB1 est modulée positivement par l'IMC et par l'âge (non significatif après ajustement sur l'IMC). Tandis que l'effet de l'âge avait déjà été discuté dans la littérature, l'effet de l'IMC sur l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs n'avait jamais été rapporté. De plus, chez les femmes, nous observons que le taux de lymphocytes est corrélé à cette expression. Contrairement à ce que certains auteurs ont rapportés pour C3435T ou G2677W, nous ne mettons en évidence aucun effet de 8 polymorphismes d'*ABCB1* sur l'expression du transporteur chez 83 sujets sains. Enfin, nous montrons que l'expression de PXR est significativement supérieure chez les hommes par rapport aux femmes. Une corrélation significative avec les GGT est également observée en corrélations simples mais disparaît après prise en considération de l'effet du sexe.

Sachant qu'une corrélation positive entre l'expression d'ABCB1 et de PXR dans des PBMCs avait été précédemment décrite par quelques auteurs sur un faible nombre de sujets, nous avons étudié si nous retrouvions cette corrélation dans notre population. Nous ne montrons aucune association entre l'expression de l'ARNm du transporteur et de son facteur de transcription. Il faut souligner qu'ABCB1 est exprimé environ 20 fois plus que PXR ce qui pourrait masquer cette corrélation. Cela pourrait s'expliquer également par une inconstance de l'expression de PXR dans les PBMCs. Cependant, d'autres auteurs ont observé une expression de PXR élevée dans les PBMCs et il serait intéressant de mesurer de nouveau l'expression de PXR dans les PBMCs de nos sujets par un autre protocole que celui utilisé dans ce travail.

ABCB1 et PXR étant exprimés constitutivement dans les PBMCs des sujets sains et l'analyse génétique effectuée dans la première partie de ce travail nous ayant permis de mettre en évidence des associations significatives entre génotypes d'*ABCB1* et taux de lipides plasmatiques, notre dernier objectif était donc d'évaluer chez ces 83 sujets si l'expression

dans les PBMCs du transporteur ABCB1; et de PXR ; était également associée à une modulation des taux plasmatiques de certains lipides/apolipoprotéines.

L'analyse de corrélation simple fait apparaître que l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs tend à être liée au taux de triglycérides dans la population totale ($p=0,054$) et au taux de HDL chez les hommes ($p=0,070$). Cependant, après prise en compte des autres facteurs influençant la variabilité des lipides, nous ne montrons aucune association significative entre l'expression de l'ARNm d'ABCB1 ; ou de PXR ; dans les PBMCs et le taux de lipides plasmatiques chez 83 sujets sains de la cohorte STANISLAS.

Plusieurs hypothèses émergent donc : 1) la puissance de notre étude serait insuffisante pour dégager une telle association. Il serait alors intéressant de reproduire ce travail chez un plus grand nombre de sujets, 2) les PBMCs de sujets sains ne seraient pas un bon modèle d'étude des associations entre transporteur ABCB1 et concentrations lipides plasmatiques ou 3) le rôle du transporteur ABCB1 serait mineur dans l'homéostasie des lipides, bien que nous ayons observé des associations intéressantes entre ses polymorphismes et les taux de lipides plasmatiques. D'autre part, les résultats de ce travail ne clarifient pas si les taux de lipides plasmatiques pourraient être corrélés à l'expression d'ABCB1 dans d'autres organes, tels que l'intestin.

L'expression de l'ARNm d'ABCB1 serait liée à la fonctionnalité du transporteur dans les PBMCs. La régulation de l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs serait également conservée. Ainsi, l'expression dans les PBMCs répond à des facteurs connus comme inducteurs de l'expression d'ABCB1 dans d'autres tissus tels que la rifampicine [162]. L'étude du niveau d'expression d'ABCB1 dans les PBMCs est d'intérêt majeur pour optimiser l'efficacité et la sûreté des médicaments agissant principalement au niveau de ces cellules tels que des antirétroviraux ou des agents anticancéreux et transportés par ce transporteur [113, 230]. Il a également été montré que l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs est significativement corrélée à la modulation des taux de lipides en réponse au traitement par statine ainsi qu'au risque d'effets indésirables dus à cette classe pharmacologique [244]. L'atorvastatine, substrat efflué hors des cellules par ABCB1, inhiberait l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs [244] augmentant ainsi son efficacité. Ainsi, Rodrigues et al., [244] ont montré que l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs de sujets hyperlipémiques est corrélée positivement avec l'activité de la créatine kinase (témoin de rhabdomyolyse) et négativement avec la réduction du cholestérol total après traitement. Bien que le PBMC ne soit pas considéré comme le lieu

majeur d'activité des statines, il est donc représentatif de l'effet au niveau de l'organisme de cette classe de médicaments.

D'un autre côté, l'expression du transporteur ABCB1 n'est pas régulée de façon homogène entre organes et l'influence des xénobiotiques et de l'alimentation, à laquelle sont exposés différemment les tissus, provoquent des différences d'expression de ce transporteur rendant impossible l'utilisation d'un tissu comme substitut d'un autre tissu. En particulier, les PBMCs, d'intérêt certain car facilement accessibles, ne pourrait pas servir de substitut à l'intestin et au foie ; organes clés de l'absorption et du métabolisme ; ou à la barrière hémato-encéphalique pour l'étude de l'expression ou de l'activité d'ABCB1 [113, 230, 238]. Les résultats de notre travail ne clarifient donc pas si les taux de lipides plasmatiques pourraient être corrélés à l'expression d'ABCB1 et à sa fonction. Une étude sur les associations entre taux de lipides plasmatiques et expression d'ABCB1 dans d'autres tissus pourrait donner d'autres résultats. En effet, il a été proposé qu'ABCB1 ait un rôle dans la régulation du cholestérol au niveau de l'intestin par exemple. Ainsi, Tessner et al., [141], ont montré in vitro que le taux d'expression d'ABCB1 dans des cellules intestinales peut influencer le taux de cholestérol absorbé via ces cellules. En effet, des cellules épithéliales d'intestin murin transfectées pour le gène *MDR1* humain présentent une augmentation de l'expression de la protéine ABCB1 et une augmentation de l'import de cholestérol par rapport aux cellules non transfectées. De plus, malgré une synthèse de cholestérol normale, les souris déficientes en *mdr1a* et *mdr1b* (équivalent d'ABCB1 chez l'homme) ont des concentrations plasmatiques en cholestérol plus faibles associées à une augmentation de la perte fécale de cholestérol, suggérant un rôle important d'ABCB1 dans la réabsorption intestinale du cholestérol [142-144].

Nous montrons que les polymorphismes d'*ABCB1* peuvent moduler le taux de lipides et d'apolipoprotéines plasmatiques chez le sujet sain comme chez le sujet à risque cardiovasculaire élevé. Cependant, nos résultats dans la cohorte STANISLAS ne permettent pas de proposer l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs comme biomarqueur du risque cardiovasculaire. Il est toutefois difficile de trancher quant à la pertinence de l'association entre expression d'ABCB1 dans les PBMCs et taux de lipides en ayant travaillé exclusivement chez le sujet sain.

Il serait intéressant de reproduire cette étude d'expression dans les PBMCs de sujets à risque cardiovasculaire élevé, les anomalies du bilan lipidique pouvant être une condition de la

stimulation de l'activité d'ABCB1 dans les PBMCs. L'isolement des PBMCs n'a pas été prévu dans l'étude HYDROGENE. Nous ne pouvions donc réaliser d'analyse transcriptomique chez ces patients. Une alternative pourrait être la mise en culture primaire de lymphocytes fraîchement isolés ou l'utilisation d'un modèle in vitro de PBMCs permettant d'induire l'expression du transporteur ABCB1. Dans cette perspective, nous avons étudié les polymorphismes d'*ABCB1* dans plusieurs lignées cellulaires et nous avons montré qu'elles présentent toutes des allèles mutés pour *ABCB1*. Ceci pourrait influencer l'expression du transporteur et devrait être pris en compte pour le choix du meilleur modèle d'étude des liens entre lipides et expression induite d'ABCB1.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

1. ANAES, Méthode d'évaluation du risque cardio-vasculaire global. 2004, Paris: Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé. 1-102.
2. Montaye M, Ducimetière P, Ruidavets JB, Arveiler D, Dallongeville J, Bingham A, Ferrières J, Wagner A and Amouyel P. Le gradient Nord-Sud de la morbidité et de la mortalité coronaires en France : données récentes des registres français des cardiopathies ischémiques, 1997-2002. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2006:62-64.
3. Schiele F, De Bacquer D, Vincent-Viry M, Beisiegel U, Ehnholm C, Evans A, Kafatos A, Martins MC, Sans S, Sass C, Visvikis S, De Backer G and Siest G. Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis*, 2000. 152:475-88.
4. ORSAS, La santé observée en Lorraine. Lorraine, Editor. DRASS, ARH, CRAM d'Alsace-Moselle, CRAM du Nord-Est, URCAM & ORSAS: 2006. 120p.
5. Poulter N. Coronary heart disease is a multifactorial disease. *Am J Hypertens*, 1999. 12:92S-95S.
6. Hayman LL. Abnormal blood lipids: is it environment or is it genes? *J Cardiovasc Nurs*, 2000. 14:39-49.
7. Pallaud C, Gueguen R, Sass C, Grow M, Cheng S, Siest G and Visvikis S. Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas Cohort. *J Lipid Res*, 2001. 42:1879-90.
8. Le Pen C, Lemasson H and Roullière-Lelidéc C, La consommation médicamenteuse dans 5 pays européens : une réévaluation. 2007, LEEM: Paris. 62 p.
9. Auvray L and Le Fur P, Améliorer la mesure de la consommation pharmaceutique : une nouvelle méthode de recueil. 2002, CREDES, Bulletin d'information en économie de la santé N°54.
10. Cavalié P, Coignard F, Leclerc S, Maugendre P and Rozet K, Analyse des ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux. 1991-2001. 2003, AFSSAPS: Saint-Denis. 94p.
11. Morozova S, Suc-Royer I and Auwerx J. [Cholesterol metabolism modulators and the future of atherosclerosis therapy]. *Med Sci (Paris)*, 2004. 20:685-90.
12. Marques-Vidal P, Montaye M, Ruidavets JB, Amouyel P and Ferrieres J. Evolution and cost trends of antihypertensive and hypolipidaemic drug treatment in France. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2003. 17:175-89.
13. Frerot L, Le Fur P, Le Pape A and Sermet C, L'hypertension artérielle en France : prévalence et prise en charge thérapeutique. 1999, CREDES, Bulletin d'information en économie de la santé N°22.
14. Mousques J, Renaud T and Sermet C, La variabilité des pratiques médicales en médecine générale : le cas de l'hyperlipémie. 2001, CREDES, Bulletin d'information en économie de la santé N°42.
15. Auvray L, Hengsen. F and Sermet C, La diffusion de l'innovation pharmaceutique en médecine libérale : revue de la littérature et premiers résultats français. 2003, CREDES, Bulletin d'information en économie de la santé N°73.
16. Lambert G, Chetiveaux M, Senard G, Drui D and Krempf M. [Intestinal cholesterol absorption and NPC1-L1]. *Med Sci (Paris)*, 2004. 20:636-8.
17. Ikonen E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev*, 2006. 86:1237-61.

18. Hazard SE and Patel SB. Sterolins ABCG5 and ABCG8: regulators of whole body dietary sterols. *Pflugers Arch*, 2007. 453:745-52.
19. Siest G, Jeannesson E, Berrahmoune H, Maumus S, Marteau JB, Mohr S and Visvikis S. Pharmacogenomics and drug response in cardiovascular disorders. *Pharmacogenomics*, 2004. 5:779-802.
20. Siest G, Marteau JB, Maumus S, Berrahmoune H, Jeannesson E, Samara A, Batt AM and Visvikis-Siest S. Pharmacogenomics and cardiovascular drugs: need for integrated biological system with phenotypes and proteomic markers. *Eur J Pharmacol*, 2005. 527:1-22.
21. Evans WE and Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 1999. 286:487-91.
22. Elbekai RH and El-Kadi AO. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol Ther*, 2006. 112:564-87.
23. Siest G, Jeannesson E, Marteau JB, Samara A, Marie B, Pfister M and Visvikis-Siest S. Transcription factor and drug-metabolizing enzyme gene expression in lymphocytes from healthy human subjects. *Drug Metab Dispos*, 2008. 36:182-9.
24. Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M. [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2006. 64:535-48.
25. Stefkova J, Poledne R and Hubacek JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*, 2004. 53:235-43.
26. Sugiura T, Kato Y and Tsuji A. Role of SLC xenobiotic transporters and their regulatory mechanisms PDZ proteins in drug delivery and disposition. *J Control Release*, 2006. 116:238-46.
27. Efferth T. Adenosine triphosphate-binding cassette transporter genes in ageing and age-related diseases. *Ageing Res Rev*, 2003. 2:11-24.
28. Hennessy M and Spiers JP. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacol Res*, 2007. 55:1-15.
29. Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK and Poolman B. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett*, 2006. 580:1023-35.
30. Schmitz G, Liebisch G and Langmann T. Lipidomic strategies to study structural and functional defects of ABC-transporters in cellular lipid trafficking. *FEBS Lett*, 2006. 580:5597-610.
31. Marzolini C, Paus E, Buclin T and Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*, 2004. 75:13-33.
32. Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W and Schmitz G. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem*, 2003. 49:230-8.
33. Humma LM and Terra SG. Pharmacogenetics and cardiovascular disease: impact on drug response and applications to disease management. *Am J Health Syst Pharm*, 2002. 59:1241-52.
34. Gillet JP, Efferth T and Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1775:237-62.
35. Schmitz G and Drobnik W. ATP-binding cassette transporters in macrophages: promising drug targets for treatment of cardiovascular disease. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002. 3:853-8.
36. Oram JF and Vaughan AM. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res*, 2006. 99:1031-43.

37. Orłowski S, Comera C, Terce F and Collet X. Lipid rafts: dream or reality for cholesterol transporters? *Eur Biophys J*, 2007. 36:869-85.
38. Takahashi K, Kimura Y, Nagata K, Yamamoto A, Matsuo M and Ueda K. ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis. *Med Mol Morphol*, 2005. 38:2-12.
39. Kaminski WE, Piehler A and Wenzel JJ. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1762:510-24.
40. Kusuhara H and Sugiyama Y. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch*, 2007. 453:735-44.
41. Wenzel JJ, Piehler A and Kaminski WE. ABC A-subclass proteins: gatekeepers of cellular phospho- and sphingolipid transport. *Front Biosci*, 2007. 12:3177-93.
42. Kimura Y, Kioka N, Kato H, Matsuo M and Ueda K. Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol. *Biochem J*, 2007. 401:597-605.
43. Attie AD. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. *Trends Biochem Sci*, 2007. 32:172-9.
44. Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L and von Eckardstein A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1761:655-66.
45. Vaughan AM and Oram JF. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res*, 2006. 47:2433-43.
46. Probst MC, Thumann H, Aslanidis C, Langmann T, Buechler C, Patsch W, Baralle FE, Dall'ingia-Thie GM, Geisel J, Keller C, Menys VC and Schmitz G. Screening for functional sequence variations and mutations in ABCA1. *Atherosclerosis*, 2004. 175:269-79.
47. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB and Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J Clin Invest*, 2004. 114:1343-53.
48. Brunham LR, Singaraja RR and Hayden MR. Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis. *Annu Rev Nutr*, 2006. 26:105-29.
49. Tregouet DA, Ricard S, Nicaud V, Arnould I, Soubigou S, Rosier M, Duverger N, Poirier O, Mace S, Kee F, Morrison C, Deneffe P, Tiret L, Evans A, Deleuze JF and Cambien F. In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24:775-81.
50. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F and Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101:9774-9.
51. Schmitz G and Langmann T. High-density lipoproteins and ATP-binding cassette transporters as targets for cardiovascular drug therapy. *Curr Opin Investig Drugs*, 2005. 6:907-19.
52. Klucken J, Buchler C, Orso E, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diederich W, Drobnik W, Dean M, Allikmets R and Schmitz G. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97:817-22.
53. Klett EL, Lee MH, Adams DB, Chavin KD and Patel SB. Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine. *BMC Gastroenterol*, 2004. 4:21.
54. Hui DY and Howles PN. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Semin Cell Dev Biol*, 2005. 16:183-92.
55. Yasuhisa K, Shin-ya M, Michinori M and Kazumitsu U. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1. *Cancer Sci*, 2007. 98:1303-10.

56. Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamaki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA, Rauramaa R and Miettinen TA. Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res*, 2004. 45:1660-5.
57. Hubacek JA, Berge KE, Stefkova J, Pitha J, Skodova Z, Lanska V and Poledne R. Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels. *Physiol Res*, 2004. 53:395-401.
58. Oude Elferink RP and Paulusma CC. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch*, 2007. 453:601-10.
59. Chinn LW and Kroetz DL. ABCB1 pharmacogenetics: progress, pitfalls, and promise. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. 81:265-9.
60. Damiani D, Michieli M, Michelutti A, Geromin A, Raspadori D, Fanin R, Savignano C, Giacca M, Pileri S, Mallardi F and et al. Expression of multidrug resistance gene (MDR-1) in human normal leukocytes. *Haematologica*, 1993. 78:12-7.
61. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N and Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. 297:1137-43.
62. Frelet A and Klein M. Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Lett*, 2006. 580:1064-84.
63. Sauna ZE and Ambudkar SV. About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol Cancer Ther*, 2007. 6:13-23.
64. Ambudkar SV, Kim IW and Sauna ZE. The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharm Sci*, 2006. 27:392-400.
65. Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54:1295-310.
66. Mizutani T, Masuda M, Nakai E, Furumiya K, Togawa H, Nakamura Y, Kawai Y, Nakahira K, Shinkai S and Takahashi K. Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1). *Curr Drug Metab*, 2008. 9:167-74.
67. Johnstone RW, Ruefli AA and Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci*, 2000. 25:1-6.
68. Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet*, 2005. 20:391-414.
69. Vogelgesang S, Warzok RW, Cascorbi I, Kunert-Keil C, Schroeder E, Kroemer HK, Siegmund W, Walker LC and Pahnke J. The role of P-glycoprotein in cerebral amyloid angiopathy; implications for the early pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 2004. 1:121-5.
70. Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther*, 2006. 112:457-73.
71. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M and Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97:3473-8.
72. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M and Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J*, 2007. 7:154-79.
73. Tang K, Ngoi SM, Gwee PC, Chua JM, Lee EJ, Chong SS and Lee CG. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics*, 2002. 12:437-50.

74. Okamura N, T S and K O. Pharmacogenomics of MDR and MRP subfamilies. *Personalized Medicine*, 2004. 1:85-104.
75. Sunder-Plassmann R, Rieger S, Endler G, Brunner M, Muller M and Mannhalter C. Simultaneous analysis of MDR1 C3435T, G2677T/A, and C1236T genotypes by multiplexed mutagenically separated PCR. *Clin Chem Lab Med*, 2005. 43:192-4.
76. Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B, Warzok R, Kroemer HK and Cascorbi I. The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther*, 2002. 72:572-83.
77. Pauli-Magnus C and Kroetz DL. Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1). *Pharm Res*, 2004. 21:904-13.
78. Takane H, Kobayashi D, Hirota T, Kigawa J, Terakawa N, Otsubo K and Ieiri I. Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (ABCB1) gene. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. 311:1179-87.
79. Woodahl EL, Yang Z, Bui T, Shen DD and Ho RJ. Multidrug resistance gene G1199A polymorphism alters efflux transport activity of P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. 310:1199-207.
80. Moriya Y, Nakamura T, Horinouchi M, Sakaeda T, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Gotoh A, Fujimoto S, Matsuo M, Kasuga M and Okumura K. Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull*, 2002. 25:1356-9.
81. Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW, Bohm M, Lehmann C, Wendt M, Cascorbi I and Kroemer HK. Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics*, 2004. 14:381-5.
82. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG and Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. 70:189-99.
83. Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Matsuo M, Kasuga M and Okumura K. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 2002. 71:297-303.
84. Cavaco I, Gil JP, Gil-Berglund E and Ribeiro V. CYP3A4 and MDR1 alleles in a Portuguese population. *Clin Chem Lab Med*, 2003. 41:1345-50.
85. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB and Telenti A. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet*, 2002. 359:30-6.
86. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL and Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*, 2005. 15:693-704.
87. Owen A, Chandler B and Back DJ. The implications of P-glycoprotein in HIV: friend or foe? *Fundam Clin Pharmacol*, 2005. 19:283-96.
88. Saitoh A, Singh KK, Powell CA, Fenton T, Fletcher CV, Brundage R, Starr S and Spector SA. An MDR1-3435 variant is associated with higher plasma nelfinavir levels and more rapid virologic response in HIV-1 infected children. *Aids*, 2005. 19:371-80.

89. Fisher SD, Miller TL and Lipshultz SE. Impact of HIV and highly active antiretroviral therapy on leukocyte adhesion molecules, arterial inflammation, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2006. 185:1-11.
90. Alonso-Villaverde C, Coll B, Gomez F, Parra S, Camps J, Joven J and Masana L. The efavirenz-induced increase in HDL-cholesterol is influenced by the multidrug resistance gene 1 C3435T polymorphism. *Aids*, 2005. 19:341-2.
91. Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC and Hutz MH. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther*, 2005. 78:551-8.
92. Kajinami K, Brousseau ME, Ordovas JM and Schaefer EJ. Polymorphisms in the multidrug resistance-1 (MDR1) gene influence the response to atorvastatin treatment in a gender-specific manner. *Am J Cardiol*, 2004. 93:1046-50.
93. Bercovich D, Friedlander Y, Korem S, Houminer A, Hoffman A, Kleinberg L, Shochat C, Leitersdorf E and Meiner V. The association of common SNPs and haplotypes in the CETP and MDR1 genes with lipids response to fluvastatin in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 2006. 185:97-107.
94. Thompson JF, Man M, Johnson KJ, Wood LS, Lira ME, Lloyd DB, Banerjee P, Milos PM, Myrand SP, Paulauskis J, Milad MA and Sasiela WJ. An association study of 43 SNPs in 16 candidate genes with atorvastatin response. *Pharmacogenomics J*, 2005. 5:352-8.
95. Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F and Andriulli A. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*, 2006. 12:3636-44.
96. Brant SR, Panhuysen CI, Nicolae D, Reddy DM, Bonen DK, Karaliukas R, Zhang L, Swanson E, Datta LW, Moran T, Ravenhill G, Duerr RH, Achkar JP, Karban AS and Cho JH. MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*, 2003. 73:1282-92.
97. Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A, Fennell J, Drummond H, Mowat C, Arnott ID and Satsangi J. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2005. 128:288-96.
98. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM and Eichelbaum M. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2003. 124:26-33.
99. Furuno T, Landi MT, Ceroni M, Caporaso N, Bernucci I, Nappi G, Martignoni E, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Schwab M and Zanger UM. Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics*, 2002. 12:529-34.
100. Drozdik M, Bialecka M, Mysliwiec K, Honczarenko K, Stankiewicz J and Sych Z. Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics*, 2003. 13:259-63.
101. Lee G and Bendayan R. Functional expression and localization of P-glycoprotein in the central nervous system: relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders. *Pharm Res*, 2004. 21:1313-30.
102. Siegmund M, Brinkmann U, Schaeffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M, Fritz P, Burk O, Decker J, Alken P, Rothenpieler U, Kerb R, Hoffmeyer S and Brauch H. Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol*, 2002. 13:1847-54.

103. Rund D, Azar I and Shperling O. A mutation in the promoter of the multidrug resistance gene (MDR1) in human hematological malignancies may contribute to the pathogenesis of resistant disease. *Adv Exp Med Biol*, 1999. 457:71-5.
104. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA and McLeod HL. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics*, 2001. 11:217-21.
105. Woodahl EL and Ho RJ. The role of MDR1 genetic polymorphisms in interindividual variability in P-glycoprotein expression and function. *Curr Drug Metab*, 2004. 5:11-9.
106. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM and Clark AG. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics*, 2003. 13:481-94.
107. Saito K, Miyake S, Moriya H, Yamazaki M, Itoh F, Imai K, Kurosawa N, Owada E and Miyamoto A. Detection of the four sequence variations of MDR1 gene using TaqMan MGB probe based real-time PCR and haplotype analysis in healthy Japanese subjects. *Clin Biochem*, 2003. 36:511-8.
108. Scotto KW. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene*, 2003. 22:7496-511.
109. Labialle S, Gayet L, Marthinet E, Rigal D and Baggetto LG. Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem Pharmacol*, 2002. 64:943-8.
110. Matic M, Mahns A, Tsoi M, Corradin A, Polly P and Robertson GR. Pregnane X receptor: promiscuous regulator of detoxification pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. 39:478-83.
111. Urquhart BL, Tirona RG and Kim RB. Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. *J Clin Pharmacol*, 2007. 47:566-78.
112. Hung CC, Jen Tai J, Kao PJ, Lin MS and Liou HH. Association of polymorphisms in NR1I2 and ABCB1 genes with epilepsy treatment responses. *Pharmacogenomics*, 2007. 8:1151-1158.
113. Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'Graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE and Weiss J. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem Pharmacol*, 2005. 70:949-58.
114. Owen A, Chandler B, Back DJ and Khoo SH. Expression of pregnane-X-receptor transcript in peripheral blood mononuclear cells and correlation with MDR1 mRNA. *Antivir Ther*, 2004. 9:819-21.
115. Lamba JK, Lamba V, Yasuda K, Lin YS, Assem M, Thompson E, Strom S and Schuetz E. Expression of constitutive androstane receptor splice variants in human tissues and their functional consequences. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. 311:811-21.
116. Schote AB, Turner JD, Schiltz J and Muller CP. Nuclear receptors in human immune cells: expression and correlations. *Mol Immunol*, 2007. 44:1436-45.
117. Burk O, Arnold KA, Geick A, Tegude H and Eichelbaum M. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression. *Biol Chem*, 2005. 386:503-13.
118. Cerveny L, Svecova L, Anzenbacherova E, Vrzal R, Staud F, Dvorak Z, Ulrichova J, Anzenbacher P and Pavek P. Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression

- by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab Dispos*, 2007. 35:1032-41.
119. Puhlmann U, Ziemann C, Ruedell G, Vorwerk H, Schaefer D, Langebrake C, Schuermann P, Creutzig U and Reinhardt D. Impact of the cyclooxygenase system on doxorubicin-induced functional multidrug resistance 1 overexpression and doxorubicin sensitivity in acute myeloid leukemic HL-60 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 312:346-54.
 120. Hartmann G, Kim H and Piquette-Miller M. Regulation of the hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory cytokines in mice. *Int Immunopharmacol*, 2001. 1:189-99.
 121. Rodrigues AC, Rebecchi IM, Bertolami MC, Faludi AA, Hirata MH and Hirata RD. High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with MDR1 haplotypes in Brazilian hypercholesterolemic individuals of European descent. *Braz J Med Biol Res*, 2005. 38:1389-97.
 122. Leon C, Sachs-Barrable K and Wasan KM. Does p-glycoprotein play a role in gastrointestinal absorption and cellular transport of dietary cholesterol? *Drug Dev Ind Pharm*, 2006. 32:779-82.
 123. Dean M, Hamon Y and Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*, 2001. 42:1007-17.
 124. Orłowski S, Martin S and Escargueil A. P-glycoprotein and 'lipid rafts': some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?). *Cell Mol Life Sci*, 2006. 63:1038-59.
 125. Lavie Y and Liscovitch M. Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences. *Glycoconj J*, 2000. 17:253-9.
 126. Troost J, Albermann N, Emil Haefeli W and Weiss J. Cholesterol modulates P-glycoprotein activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 316:705-11.
 127. Troost J, Lindenmaier H, Haefeli WE and Weiss J. Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells. *Mol Pharmacol*, 2004. 66:1332-9.
 128. Garrigues A, Escargueil AE and Orłowski S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99:10347-52.
 129. Gayet L, Dayan G, Barakat S, Labialle S, Michaud M, Cogne S, Mazane A, Coleman AW, Rigal D and Baggetto LG. Control of P-glycoprotein activity by membrane cholesterol amounts and their relation to multidrug resistance in human CEM leukemia cells. *Biochemistry*, 2005. 44:4499-509.
 130. Rothnie A, Theron D, Soceneantu L, Martin C, Traikia M, Berridge G, Higgins CF, Devaux PF and Callaghan R. The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence. *Eur Biophys J*, 2001. 30:430-42.
 131. Luker GD, Pica CM, Kumar AS, Covey DF and Piwnicka-Worms D. Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains. *Biochemistry*, 2000. 39:7651-61.
 132. Luker GD, Nilsson KR, Covey DF and Piwnicka-Worms D. Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol. *J Biol Chem*, 1999. 274:6979-91.
 133. Batetta B, Mulas MF, Petruzzo P, Putzolu M, Bonatesta RR, Sanna F, Cappai A, Brotzu G and Dessi S. Opposite pattern of MDR1 and caveolin-1 gene expression in human

- atherosclerotic lesions and proliferating human smooth muscle cells. *Cell Mol Life Sci*, 2001. 58:1113-20.
134. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW and Zwaal RF. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1439:317-30.
 135. Pohl A, Devaux PF and Herrmann A. Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1733:29-52.
 136. Debry P, Nash EA, Neklason DW and Metherall JE. Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol esterification. *J Biol Chem*, 1997. 272:1026-31.
 137. Metherall JE, Li H and Waugh K. Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem*, 1996. 271:2634-40.
 138. Issandou M and Grand-Perret T. Multidrug resistance P-glycoprotein is not involved in cholesterol esterification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 279:369-77.
 139. Batetta B, Mulas MF, Sanna F, Putzolu M, Bonatesta RR, Gasperi-Campani A, RoncuZZi L, Baiocchi D and Dessi S. Role of cholesterol ester pathway in the control of cell cycle in human aortic smooth muscle cells. *Faseb J*, 2003. 17:746-8.
 140. Le Goff W, Settle M, Greene DJ, Morton RE and Smith JD. Reevaluation of the role of the multidrug-resistant P-glycoprotein in cellular cholesterol homeostasis. *J Lipid Res*, 2006. 47:51-8.
 141. Tessner TG and Stenson WF. Overexpression of MDR1 in an intestinal cell line results in increased cholesterol uptake from micelles. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 267:565-71.
 142. Voshol PJ, Havinga R, Wolters H, Ottenhoff R, Princen HM, Oude Elferink RP, Groen AK and Kuipers F. Reduced plasma cholesterol and increased fecal sterol loss in multidrug resistance gene 2 P-glycoprotein-deficient mice. *Gastroenterology*, 1998. 114:1024-34.
 143. Luker GD, Dahlheimer JL, Ostlund RE, Jr. and Piwnicka-Worms D. Decreased hepatic accumulation and enhanced esterification of cholesterol in mice deficient in *mdr1a* and *mdr1b* P-glycoproteins. *J Lipid Res*, 2001. 42:1389-94.
 144. Tous M, Ribas V, Ferre N, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F, Alonso-Villaverde C, Coll B, Camps J and Joven J. Turpentine-induced inflammation reduces the hepatic expression of the multiple drug resistance gene, the plasma cholesterol concentration and the development of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1733:192-8.
 145. Petruzzo P, Cappai A, Brotzu G, Batetta B, Putzolu M, Mulas MF, Bonatesta RR, Sanna F and Dessi S. Lipid metabolism and molecular changes in normal and atherosclerotic vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2001. 22:31-6.
 146. Furukawa M, Nishimura M, Ogino D, Chiba R, Ikai I, Ueda N, Naito S, Kuribayashi S, Moustafa MA, Uchida T, Sawada H, Kamataki T, Funae Y and Fukumoto M. Cytochrome p450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci*, 2004. 95:520-9.
 147. Nakamoto T, Hase I, Imaoka S, Hiroi T, Oda Y, Asada A and Funae Y. Quantitative RT-PCR for CYP3A4 mRNA in human peripheral lymphocytes: induction of CYP3A4 in lymphocytes and in liver by rifampicin. *Pharmacogenetics*, 2000. 10:571-5.
 148. Nguyen LT, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Dole K, Miller C, Planter M, Patrick K, Brownschidle C and Jacobs LD. Detection of cytochrome P450 and other drug-metabolizing enzyme mRNAs in peripheral blood mononuclear cells using DNA arrays. *Drug Metab Dispos*, 2000. 28:987-93.
 149. Patino WD, Mian OY, Kang JG, Matoba S, Bartlett LD, Holbrook B, Trout HH, 3rd, Kozloff L and Hwang PM. Circulating transcriptome reveals markers of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102:3423-8.

150. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R and Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med*, 2006. 147:126-32.
151. Raucy JL, Schultz ED, Wester MR, Arora S, Johnston DE, Omdahl JL and Carpenter SP. Human lymphocyte cytochrome P450 2E1, a putative marker for alcohol-mediated changes in hepatic chlorzoxazone activity. *Drug Metab Dispos*, 1997. 25:1429-35.
152. Baron JM, Zwadlo-Klarwasser G, Jugert F, Hamann W, Rubben A, Mukhtar H and Merk HF. Cytochrome P450 1B1: a major P450 isoenzyme in human blood monocytes and macrophage subsets. *Biochem Pharmacol*, 1998. 56:1105-10.
153. Dassi C, Signorini S, Gerthoux P, Cazzaniga M and Brambilla P. Cytochrome P450 1B1 mRNA measured in blood mononuclear cells by quantitative reverse transcription-PCR. *Clin Chem*, 1998. 44:2416-21.
154. Spencer DL, Masten SA, Lanier KM, Yang X, Grassman JA, Miller CR, Sutter TR, Lucier GW and Walker NJ. Quantitative analysis of constitutive and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced cytochrome P450 1B1 expression in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999. 8:139-46.
155. Starkel P, Sempoux C, Van Den Berge V, Stevens M, De Saeger C, Desager JP and Horsmans Y. CYP 3A proteins are expressed in human neutrophils and lymphocytes but are not induced by rifampicin. *Life Sci*, 1999. 64:643-53.
156. Takeda Y, Furukawa K, Inaba S, Miyamori I and Mabuchi H. Genetic analysis of aldosterone synthase in patients with idiopathic hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84:1633-7.
157. Boucher P, Seree E, Vidon C, de Souza AC, Villard PH, Chambon R, Barra Y and Vallon JJ. Dietary lipids affect human ethanol-inducible CYP2E1 gene expression in vivo in mononuclear cells. *Life Sci*, 2000. 67:1307-16.
158. Krovat BC, Tracy JH and Omiecinski CJ. Fingerprinting of cytochrome P450 and microsomal epoxide hydrolase gene expression in human blood cells. *Toxicol Sci*, 2000. 55:352-60.
159. Smart J and Daly AK. Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. *Pharmacogenetics*, 2000. 10:11-24.
160. Finnstrom N, Thorn M, Loof L and Rane A. Independent patterns of cytochrome P450 gene expression in liver and blood in patients with suspected liver disease. *Eur J Clin Pharmacol*, 2001. 57:403-9.
161. Hannon-Fletcher MP, O'Kane MJ, Moles KW, Barnett YA and Barnett CR. Lymphocyte cytochrome P450-CYP2E1 expression in human IDDM subjects. *Food Chem Toxicol*, 2001. 39:125-32.
162. Asghar A, Gorski JC, Haehner-Daniels B and Hall SD. Induction of multidrug resistance-1 and cytochrome P450 mRNAs in human mononuclear cells by rifampin. *Drug Metab Dispos*, 2002. 30:20-6.
163. Finnstrom N, Ask B, Dahl ML, Gadd M and Rane A. Intra-individual variation and sex differences in gene expression of cytochromes P450 in circulating leukocytes. *Pharmacogenomics J*, 2002. 2:111-6.
164. Carcillo JA, Adedoyin A, Burckart GJ, Frye RF, Venkataramanan R, Knoll C, Thummel K, Roskos L, Wilson JW, Sereika S, Romkes M, Bebia Z and Branch RA. Coordinated intrahepatic and extrahepatic regulation of cytochrome p4502D6 in healthy subjects and in patients after liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther*, 2003. 73:456-67.
165. Gashaw I, Kirchheiner J, Goldammer M, Bauer S, Seidemann J, Zoller K, Mrozkiewicz PM, Roots I and Brockmoller J. Cytochrome p450 3A4 messenger ribonucleic acid induction by rifampin in human peripheral blood mononuclear cells: correlation with alprazolam pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*, 2003. 74:448-57.

166. Landi MT, Bertazzi PA, Baccarelli A, Consonni D, Masten S, Lucier G, Mocarelli P, Needham L, Caporaso N and Grassman J. TCDD-mediated alterations in the AhR-dependent pathway in Seveso, Italy, 20 years after the accident. *Carcinogenesis*, 2003. 24:673-80.
167. Lin P, Hu SW and Chang TH. Correlation between gene expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR), hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt), cytochromes P4501A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1), and inducibility of CYP1A1 and CYP1B1 in human lymphocytes. *Toxicol Sci*, 2003. 71:20-6.
168. Toide K, Yamazaki H, Nagashima R, Itoh K, Iwano S, Takahashi Y, Watanabe S and Kamataki T. Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A1, in human freshly isolated white cells: trimodal distribution of Japanese population according to induction of CYP1B1 mRNA by environmental dioxins. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. 12:219-22.
169. Tuominen R, Warholm M, Moller L and Rannug A. Constitutive CYP1B1 mRNA expression in human blood mononuclear cells in relation to gender, genotype, and environmental factors. *Environ Res*, 2003. 93:138-48.
170. Lampe JW, Stepaniants SB, Mao M, Radich JP, Dai H, Linsley PS, Friend SH and Potter JD. Signatures of environmental exposures using peripheral leukocyte gene expression: tobacco smoke. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. 13:445-53.
171. Yamamoto J, Ihara K, Nakayama H, Hikino S, Satoh K, Kubo N, Iida T, Fujii Y and Hara T. Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sci*, 2004. 74:1039-49.
172. Haas CE, Brazeau D, Cloen D, Booker BM, Frerichs V, Zaranek C, Frye RF and Kufel T. Cytochrome P450 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes as a predictor of enzyme induction. *Eur J Clin Pharmacol*, 2005. 61:583-93.
173. Landi MT, Bergen AW, Baccarelli A, Patterson DG, Jr., Grassman J, Ter-Minassian M, Mocarelli P, Caporaso N, Masten SA, Pesatori AC, Pittman GS and Bell DA. CYP1A1 and CYP1B1 genotypes, haplotypes, and TCDD-induced gene expression in subjects from Seveso, Italy. *Toxicology*, 2005. 207:191-202.
174. Liangpunsakul S, Kolwankar D, Pinto A, Gorski JC, Hall SD and Chalasani N. Activity of CYP2E1 and CYP3A enzymes in adults with moderate alcohol consumption: a comparison with nonalcoholics. *Hepatology*, 2005. 41:1144-50.
175. Miura R, Nakamura K, Miura D, Miura A, Hisamatsu K, Kajiya M, Hashimoto K, Nagase S, Morita H, Fukushima Kusano K, Emori T, Ishihara K and Ohe T. Aldosterone synthesis and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Sci*, 2006. 102:288-95.
176. Wibaut-Berlaimont V, Randi AM, Mandryko V, Lunnon MW, Haskard DO and Naoumova RP. Atorvastatin affects leukocyte gene expression in dyslipidemia patients: in vivo regulation of hemostasis, inflammation and apoptosis. *J Thromb Haemost*, 2005. 3:677-85.
177. Ma J, Dempsey AA, Stamatiou D, Marshall KW and Liew CC. Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects. *Atherosclerosis*, 2007. 191:63-72.
178. Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C, Beaud B, Lecomte E, Steinmetz J, Locuty J and Chevrier P. 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.

179. Friedewald WT, Levy RI and Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 1972. 18:499-502.
180. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988. 16:1215.
181. Cheng S, Grow MA, Pallaud C, Klitz W, Erlich HA, Visvikis S, Chen JJ, Pullinger CR, Malloy MJ, Siest G and Kane JP. A multilocus genotyping assay for candidate markers of cardiovascular disease risk. *Genome Res*, 1999. 9:936-49.
182. Cascorbi I, Gerloff T, John A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U and Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. 69:169-74.
183. Le Morvan V, Formento JL, Milano G, Bonnet J and Robert J. Techniques de recherche des polymorphismes génétiques. *Oncologie*, 2005. 7:7-16.
184. Marteau JB, Mohr S, Pfister M and Visvikis-Siest S. Collection and storage of human blood cells for mRNA expression profiling: a 15-month stability study. *Clin Chem*, 2005. 51:1250-2.
185. Visvikis-Siest S, Marteau JB, Samara A, Berrahmoune H, Marie B and Pfister M. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): a possible model for studying cardiovascular biology systems. *Clin Chem Lab Med*, 2007.
186. Chang TK, Bandiera SM and Chen J. Constitutive androstane receptor and pregnane X receptor gene expression in human liver: interindividual variability and correlation with CYP2B6 mRNA levels. *Drug Metab Dispos*, 2003. 31:7-10.
187. Tregouet DA, Barbaux S, Escolano S, Tahri N, Golmard JL, Tiret L and Cambien F. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet*, 2002. 11:2015-23.
188. Jeannesson E, Albertini L, Siest G, Gomes AM, Ribeiro V, Aslanidis C, Schmitz G and Visvikis-Siest S. Determination of ABCB1 polymorphisms and haplotypes frequencies in a French population. *Fundam Clin Pharmacol*, 2007. 21:411-8.
189. Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, Hurault De Ligny B, Le Meur Y, Touchard G, Buchler M, Laurent-Puig P, Tregouet D, Beaune P, Daly A, Legendre C and Marquet P. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther*, 2004. 75:422-33.
190. Pechandova K, Buzkova H, Slanar O and Perlik F. Polymorphisms of the MDR1 Gene in the Czech Population. *Folia Biol (Praha)*, 2006. 52:184-9.
191. Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K, Gerloff T, Chernov JN and Roots I. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003. 59:303-12.
192. Tan EK, Drozdik M, Bialecka M, Honczarenko K, Klodowska-Duda G, Teo YY, Tang K, Wong LP, Chong SS, Tan C, Yew K, Zhao Y and Lee CG. Analysis of MDR1 haplotypes in Parkinson's disease in a white population. *Neurosci Lett*, 2004. 372:240-4.
193. Bernal ML, Sinues B, Fanlo A and Mayayo E. Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population. *Ther Drug Monit*, 2003. 25:107-11.
194. Chowbay B, Li H, David M, Cheung YB and Lee EJ. Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. *Br J Clin Pharmacol*, 2005. 60:159-71.
195. Kim RB. MDR1 single nucleotide polymorphisms: multiplicity of haplotypes and functional consequences. *Pharmacogenetics*, 2002. 12:425-7.

196. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV and Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 2007. 315:525-8.
197. Paine MF, Ludington SS, Chen ML, Stewart PW, Huang SM and Watkins PB. Do men and women differ in proximal small intestinal CYP3A or P-glycoprotein expression? *Drug Metab Dispos*, 2005. 33:426-33.
198. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nussler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M and Zanger UM. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology*, 2003. 38:978-88.
199. Garrigos M, Mir LM and Orłowski S. Competitive and non-competitive inhibition of the multidrug-resistance-associated P-glycoprotein ATPase--further experimental evidence for a multisite model. *Eur J Biochem*, 1997. 244:664-73.
200. Shapiro AB, Fox K, Lam P and Ling V. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur J Biochem*, 1999. 259:841-50.
201. Kim WY and Benet LZ. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. *Pharm Res*, 2004. 21:1284-93.
202. Frohlich M, Albermann N, Sauer A, Walter-Sack I, Haefeli WE and Weiss J. In vitro and ex vivo evidence for modulation of P-glycoprotein activity by progestins. *Biochem Pharmacol*, 2004. 68:2409-16.
203. Benton JL, Ding J, Tsai MY, Shea S, Rotter JJ, Burke GL and Post W. Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*, 2007. 193:352-60.
204. Jensen MK, Pai JK, Mukamal KJ, Overvad K and Rimm EB. Common genetic variation in the ATP-binding cassette transporter A1, plasma lipids, and risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 2007. 195:e172-80.
205. Viturro E, de Oya M, Lasuncion MA, Gorgojo L, Moreno JM, Benavente M, Cano B and Garces C. Cholesterol and saturated fat intake determine the effect of polymorphisms at ABCG5/ABCG8 genes on lipid levels in children. *Genet Med*, 2006. 8:594-9.
206. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Steffensen R and Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABCA1 predicts ischemic heart disease in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28:180-6.
207. Mantaring M, Rhyne J, Ho Hong S and Miller M. Genotypic variation in ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1) as contributors to the high and low high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) phenotype. *Transl Res*, 2007. 149:205-10.
208. Souverein OW, Jukema JW, Boekholdt SM, Zwinderman AH and Tanck MW. Polymorphisms in APOA1 and LPL genes are statistically independently associated with fasting TG in men with CAD. *Eur J Hum Genet*, 2005. 13:445-51.
209. Clee SM, Kastelein JJ, van Dam M, Marcil M, Roomp K, Zwarts KY, Collins JA, Roelants R, Tamasawa N, Stulc T, Suda T, Ceska R, Boucher B, Rondeau C, DeSouich C, Brooks-Wilson A, Molhuizen HO, Frohlich J, Genest J, Jr. and Hayden MR. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *J Clin Invest*, 2000. 106:1263-70.
210. Evans D and Beil FU. The association of the R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) gene with coronary heart disease and hyperlipidaemia. *J Mol Med*, 2003. 81:264-70.
211. Pasdar A, Yadegarfar G, Cumming A, Whalley L, St Clair D and MacLeod MJ. The effect of ABCA1 gene polymorphisms on ischaemic stroke risk and relationship with lipid profile. *BMC Med Genet*, 2007. 8:30.

212. Katzov H, Bennet AM, Hoglund K, Wiman B, Lutjohann D, Brookes AJ, Andreasen N, Blennow K, De Faire U and Prince JA. Quantitative trait loci in ABCA1 modify cerebrospinal fluid amyloid-beta 1-42 and plasma apolipoprotein levels. *J Hum Genet*, 2006. 51:171-9.
213. Von Eckardstein A, Langer C, Engel T, Schaukal I, Cignarella A, Reinhardt J, Lorkowski S, Li Z, Zhou X, Cullen P and Assmann G. ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages. *Faseb J*, 2001. 15:1555-61.
214. Hirsch-Reinshagen V, Zhou S, Burgess BL, Bernier L, McIsaac SA, Chan JY, Tansley GH, Cohn JS, Hayden MR and Wellington CL. Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain. *J Biol Chem*, 2004. 279:41197-207.
215. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Legleiter J, Han X, Fryer JD, Kowalewski T and Holtzman DM. ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem*, 2004. 279:40987-93.
216. Wahrle SE, Shah AR, Fagan AM, Smemo S, Kauwe JS, Grupe A, Hinrichs A, Mayo K, Jiang H, Thal LJ, Goate AM and Holtzman DM. Apolipoprotein E levels in cerebrospinal fluid and the effects of ABCA1 polymorphisms. *Mol Neurodegener*, 2007. 2:7.
217. Assmann G, Cullen P, Erbey J, Ramey DR, Kannenberg F and Schulte H. Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006. 16:13-21.
218. Miwa K, Inazu A, Kobayashi J, Higashikata T, Nohara A, Kawashiri M, Katsuda S, Takata M, Koizumi J and Mabuchi H. ATP-binding cassette transporter G8 M429V polymorphism as a novel genetic marker of higher cholesterol absorption in hypercholesterolaemic Japanese subjects. *Clin Sci (Lond)*, 2005. 109:183-8.
219. Plat J, Bragt MC and Mensink RP. Common sequence variations in ABCG8 are related to plant sterol metabolism in healthy volunteers. *J Lipid Res*, 2005. 46:68-75.
220. Snieder H, van Doornen LJ and Boomsma DI. Dissecting the genetic architecture of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins: lessons from twin studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19:2826-34.
221. Middelberg RP, Spector TD, Swaminathan R and Snieder H. Genetic and environmental influences on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins: effects of menopause. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22:1142-7.
222. Bigazzi F, Pino BD, Forastiere F, Pistelli R, Rossi G, Simoni M, Baldacci S, Viegi G, Bionda A and Sampietro T. HDL and clinical and biochemical correlates in Italian non-smoker women. *Clin Chem Lab Med*, 2004. 42:1408-16.
223. Klos KL, Sing CF, Boerwinkle E, Hamon SC, Rea TJ, Clark A, Fornage M and Hixson JE. Consistent effects of genes involved in reverse cholesterol transport on plasma lipid and apolipoprotein levels in CARDIA participants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26:1828-36.
224. Feitosa MF, Rice T, Rankinen T, Almasry L, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C and Rao DC. Common genetic and environmental effects on lipid phenotypes: the HERITAGE family study. *Hum Hered*, 2005. 59:34-40.
225. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA and Brown PO. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100:1896-901.
226. Raucy JL, Ingelman-Sundberg M, Carpenter S, Rannug A, Rane A, Franklin M and Romkes M. Drug metabolizing enzymes in lymphocytes. *J Biochem Mol Toxicol*, 1999. 13:223-6.

227. Handschin C and Meyer UA. Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR, and FXR. *Arch Biochem Biophys*, 2005. 433:387-96.
228. Samara A, Pfister M, Marie B and Visvikis-Siest S. Visfatin, low-grade inflammation and BMI. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008.
229. Kock K, Grube M, Jedlitschky G, Oevermann L, Siegmund W, Ritter CA and Kroemer HK. Expression of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) drug transporters in peripheral blood cells: relevance for physiology and pharmacotherapy. *Clin Pharmacokinet*, 2007. 46:449-70.
230. Oselin K, Nowakowski-Gashaw I, Mrozikiewicz PM, Wolbergs D, Pahkla R and Roots I. Quantitative determination of MDR1 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes: a possible role of genetic polymorphisms in the MDR1 gene. *Eur J Clin Invest*, 2003. 33:261-7.
231. Lucas D, Farez C, Bardou LG, Vaisse J, Attali JR and Valensi P. Cytochrome P450 2E1 activity in diabetic and obese patients as assessed by chlorzoxazone hydroxylation. *Fundam Clin Pharmacol*, 1998. 12:553-8.
232. Khemawoot P, Yokogawa K, Shimada T and Miyamoto K. Obesity-induced increase of CYP2E1 activity and its effect on disposition kinetics of chlorzoxazone in Zucker rats. *Biochem Pharmacol*, 2007. 73:155-62.
233. Markova S, Nakamura T, Sakaeda T, Makimoto H, Uchiyama H, Okamura N and Okumura K. Genotype-dependent down-regulation of gene expression and function of MDR1 in human peripheral blood mononuclear cells under acute inflammation. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2006. 21:194-200.
234. Englund G, Jacobson A, Rorsman F, Artursson P, Kindmark A and Ronnblom A. Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm Bowel Dis*, 2007. 13:291-7.
235. Fakhoury M, Lecordier J, Medard Y, Peuchmaur M and Jacqz-Agrain E. Impact of inflammation on the duodenal mRNA expression of CYP3A and P-glycoprotein in children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. 12:745-9.
236. Ludescher C, Pall G, Irschick EU and Gastl G. Differential activity of P-glycoprotein in normal blood lymphocyte subsets. *Br J Haematol*, 1998. 101:722-7.
237. Mangoni AA. The impact of advancing age on P-glycoprotein expression and activity: current knowledge and future directions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2007. 3:315-20.
238. Storch CH, Klimm HD, Heinrich T, Haefeli WE and Weiss J. Plasma LDL cholesterol has no impact on P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2007.
239. Brenner SS and Klotz U. P-glycoprotein function in the elderly. *Eur J Clin Pharmacol*, 2004. 60:97-102.
240. Jamrozik K, Balcerczak E, Smolewski P, Robey RW, Cebula B, Panczyk M, Kowalczyk M, Szmigielska-Kaplon A, Mirowski M, Bates SE and Robak T. MDR1 (ABCB1) gene polymorphism C3435T is associated with P-glycoprotein activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pharmacol Rep*, 2006. 58:720-8.
241. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M and Fromm MF. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics*, 2001. 11:293-8.
242. Owen A, Chandler B, Bray PG, Ward SA, Hart CA, Back DJ and Khoo SH. Functional correlation of P-glycoprotein expression and genotype with expression of the human immunodeficiency virus type 1 coreceptor CXCR4. *J Virol*, 2004. 78:12022-9.

243. Oselin K, Gerloff T, Mrozikiewicz PM, Pahkla R and Roots I. MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. *Fundam Clin Pharmacol*, 2003. 17:463-9.
244. Rodrigues AC, Curi R, Britto LR, Rebbechi IM, Hirata MH, Bertolami MC, Bernik MM, Dorea EL and Hirata RD. Down-regulation of ABCB1 transporter by atorvastatin in a human hepatoma cell line and in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1760:1866-73.
245. la Porte CJ, Li Y, Beique L, Foster BC, Chauhan B, Garber GE, Cameron DW and van Heeswijk RP. The effect of ABCB1 polymorphism on the pharmacokinetics of saquinavir alone and in combination with ritonavir. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. 82:389-95.
246. Moustafa MA, Ogino D, Nishimura M, Ueda N, Naito S, Furukawa M, Uchida T, Ikai I, Sawada H and Fukumoto M. Comparative analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter gene expression levels in peripheral blood leukocytes and in liver with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 2004. 95:530-6.
247. Janssens N, Janicot M, Perera T and Bakker A. Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Mol Diagn*, 2004. 8:107-13.
248. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G and Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 2004. 37:112-4, 116, 118-9.
249. Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino JJ and Gonzalez A. Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. *BMC Mol Biol*, 2008. 9:17.
250. Glenn ST, Jones CA, Liang P, Kaushik D, Gross KW and Kim HL. Expression profiling of archival renal tumors by quantitative PCR to validate prognostic markers. *Biotechniques*, 2007. 43:639-40, 642-3, 647.
251. Mogal A and Abdulkadir SA. Effects of Histone Deacetylase Inhibitor (HDACi); Trichostatin-A (TSA) on the expression of housekeeping genes. *Mol Cell Probes*, 2006. 20:81-6.
252. Jesnowski R, Backhaus C, Ringel J and Lohr M. Ribosomal highly basic 23-kDa protein as a reliable standard for gene expression analysis. *Pancreatology*, 2002. 2:421-4.
253. Lamba J, Lamba V and Schuetz E. Genetic variants of PXR (NR1I2) and CAR (NR1I3) and their implications in drug metabolism and pharmacogenetics. *Curr Drug Metab*, 2005. 6:369-83.
254. Lamba J, Lamba V, Strom S, Venkataramanan R and Schuetz E. Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the Promoter and Intron 1 of Human Pregnane X Receptor/NR1I2 and Their Association with CYP3A4 Expression. *Drug Metab Dispos*, 2008. 36:169-81.
255. King CR, Xiao M, Yu J, Minton MR, Addleman NJ, Van Booven DJ, Kwok PY, McLeod HL and Marsh S. Identification of NR1I2 genetic variation using resequencing. *Eur J Clin Pharmacol*, 2007. 63:547-54.
256. Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Wrighton SA, Hancock M, Kim RB, Strom S, Thummel K, Russell CG, Hudson JR, Jr., Schuetz EG and Boguski MS. The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics*, 2001. 11:555-72.
257. Yamaguchi H, Hishinuma T, Endo N, Tsukamoto H, Kishikawa Y, Sato M, Murai Y, Hiratsuka M, Ito K, Okamura C, Yaegashi N, Suzuki N, Tomioka Y and Goto J. Genetic variation in ABCB1 influences paclitaxel pharmacokinetics in Japanese patients with ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2006. 16:979-85.
258. Hor SY, Lee SC, Wong CI, Lim YW, Lim RC, Wang LZ, Fan L, Guo JY, Lee HS, Goh BC and Tan T. PXR, CAR and HNF4alpha genotypes and their association with

- pharmacokinetics and pharmacodynamics of docetaxel and doxorubicin in Asian patients. *Pharmacogenomics J*, 2007.
259. Lim HS, Ju Lee H, Seok Lee K, Sook Lee E, Jang IJ and Ro J. Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 2007. 25:3837-45.
 260. Barlovatz-Meimon G and Adolphe M, *Cultures de cellules animales, Méthodologies - Applications. Techniques en ...* 2003, Paris: Editions INSERM.
 261. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 1991. 47:22-31.
 262. Brandon EF, Bosch TM, Deenen MJ, Levink R, van der Wal E, van Meerveld JB, Bijl M, Beijnen JH, Schellens JH and Meijerman I. Validation of in vitro cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006. 211:1-10.
 263. Vogel CF, Sciullo E, Wong P, Kuzmicky P, Kado N and Matsumura F. Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates. *Environ Health Perspect*, 2005. 113:1536-41.
 264. Nagai F, Kato E and Tamura HO. Oxidative stress induces GSTP1 and CYP3A4 expression in the human erythroleukemia cell line, K562. *Biol Pharm Bull*, 2004. 27:492-5.
 265. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T and Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 1980. 26:171-6.
 266. Fach EM, Garulacan LA, Gao J, Xiao Q, Storm SM, Dubaquié YP, Hefta SA and Opitck GJ. In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2004. 3:1200-10.
 267. Sundstrom C and Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*, 1976. 17:565-77.
 268. Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F and Gallo R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1979. 54:713-33.
 269. Lozzio CB and Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 1975. 45:321-34.
 270. Jeannesson P, Lahlil R, Chenais B, Devy L, Gillet R, Aries A, Morceau F and Trentesaux C. Anthracyclines as tumor cell differentiating agents: effects on the regulation of erythroid gene expression. *Leuk Lymphoma*, 1997. 26:575-87.

PUBLICATIONS

REVUE 1

Pharmacogenomics and drug response in cardiovascular disorders.

Siest G, **Jeannesson E**, Berrahmoune H, Maumus S, Marteau JB, Mohr S and
Visvikis-Siest S.

Pharmacogenomics. 2004; 5 (7):779-802

REVUE 2

Pharmacogenomics and cardiovascular drugs: need for integrated biological system with phenotypes and proteomic markers.

Siest G, Marteau JB, Maumus S, Berrahmoune H, **Jeannesson E** Samara A, Batt AM and Visvikis-Siest S.

European Journal of Pharmacology. 2005; 527 (1-3):1-22

ARTICLE 1

**Frequencies of ABCB1 polymorphisms and haplotypes
in a French population.**

Jeannesson E, Albertini L, Siest G, Gomes AM, Ribeiro V, Aslanidis C,
Schmitz G and Visvikis-Siest S.

Fundamental and Clinical Pharmacology. 2007; 21 (4):411-8

ARTICLE 2

Association of ABCB1 polymorphisms with lipid and apolipoprotein concentrations in the Stanislas Cohort.

Jeannesson E, Siest G, Bastien B, Albertini L, Aslanidis C, Schmitz G and Visvikis-Siest S.

Atherosclerosis. Soumis.

Association of ABCB1 polymorphisms with lipid and apolipoprotein concentrations in the Stanislas Cohort

Elise Jeannesson^{1,2}, Gérard Siest^{1,2}*, Bérangère Bastien², Laetitia Albertini^{1,2}, Charalampos Aslanidis³, Gerd Schmitz³, Sophie Visvikis-Siest¹

¹ INSERM, CIC 9501, Equipe Génétique Cardiovasculaire, Nancy, F-54000, France

² Université Henri Poincaré - Nancy I, Faculté de Pharmacie, Nancy, F-54000, France

³ Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University of Regensburg, Regensburg, Germany

* Corresponding author: Gérard Siest, Equipe Génétique Cardiovasculaire du CIC 9501, Faculté de Pharmacie, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France ; Tel: +33 383682170; Fax: +33 383321322 ; Gerard.Siest@pharma.uhp-nancy.fr

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette ; Apo, Apolipoprotein ; BMI, Body Mass Index; Chol, Total Cholesterol; HDLc, HDL cholesterol; LD, Linkage Disequilibrium ; LDLc, LDL cholesterol; MDR1, Multi Drug Resistance 1 ; P-gp, P-glycoprotein ; SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms; TG, Triglycerides.

Abstract

Background. While involvement of ABCB1 transporter, or P-glycoprotein, is well known in drug transport, its metabolite transport role is not so well understood. Like other ABC transporters, ABCB1 might be implicated in cholesterol homeostasis and *ABCB1* polymorphisms which are responsible for drug resistance might affect lipid homeostasis. Our objective was to investigate the implication of *ABCB1* polymorphisms and haplotypes in the genetic variability of lipid constituents in healthy people.

Methods. DNA was isolated from blood of 371 individuals from the Stanislas Cohort using a salting out procedure. PCR-RFLP methods were used to genotype T-129C, G1199A, C1236T, G2677T/A and C3435T and TaqMan technology to genotype A61G, G-1A and T-76A polymorphisms. Each polymorphism was tested with plasma concentrations of total cholesterol, HDL and LDL cholesterol, triglycerides and apolipoproteins A1, B, C3 and E.

Results. After adjustment for covariates, carriers of at least one ABCB1 3435T allele had a significant higher level of apolipoprotein A1 ($p=0.005$). In addition, significant correlations were observed in a sex-dependant manner. Women carrying either wild-type allele T-76 or mutated allele 1236T had lower total cholesterol ($p\leq 0.01$) and apolipoprotein B (T-76 exclusively, $p=0.002$) (tendency with G-1 and 2677W). Haplotypes analysis was not more informative than single polymorphisms except G2677W-C3435T haplotypes on apolipoprotein A1 concentrations.

Conclusion. We showed that *ABCB1* polymorphisms contribute to the genetic variability of plasma values of lipids and lipoproteins in healthy people. Although mechanisms still remain to be determined, these results support the hypothesis that ABCB1 would be implicated in lipid physiologic homeostasis.

Keywords: ABCB1; polymorphisms; cholesterol; lipids; lipoproteins; genetic variability.

1. Introduction

The ATP-binding cassette (ABC) transporters family contains nearly 50 different transporters involved in many pathophysiologic processes [1]. Numerous transporters have been implicated in lipid transport [2] and cardiovascular diseases [3]. The best studied are ABCA1 and ABCG5/G8. ABCA1 transports free intracellular cholesterol and phospholipids to cell surface-bound lipid-poor apolipoproteins. Mutations in *ABCA1* are responsible for Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency, characterized respectively by absence and severe deficiency of HDL cholesterol (HDLc) in the plasma. In addition, at least 10% of individuals with low HDLc in the general population are heterozygous for mutations in *ABCA1* [4]. In the gut, ABCG5 and ABCG8 pump unesterified intracellular sterols, plant sterols as well as cholesterol, back into the lumen. In the liver, they pump sterols into bile [5]. A defect in *ABCG5* or *ABCG8* gene locus is responsible for beta-sitosterolemia. This pathology is characterised by an increased intestinal absorption and a decreased biliary elimination of all sterols associated with premature atherosclerotic diseases [5]. Numerous other ABC transporters have been implicated in cholesterol transport, such as ABCG1 [6].

ABCB1, also known as P-glycoprotein (P-gp), is the protein product of the polymorphic *Multi-drug-resistance 1 (MDR1)* gene. ABCB1 is highly expressed at the pharmacological barriers of the organism such as the intestine, liver, and the blood-brain barrier. It is also expressed in peripheral blood cells such as lymphocytes [7]. A well known function of this protein is the protection of cells against toxic substances or metabolites. Indeed, ABCB1 is an efflux pump which extrudes a wide variety of structurally unrelated and lipophilic molecules from cells including numerous drugs. ABCB1 is mainly studied for its involvement in the commonly known phenomenon of multidrug resistance to multiple agents including anticancer, immunosuppressive or antiviral drugs [7]. In addition to drug transport,

ABCB1 would extrude numerous physiological substrates or metabolites such as phospholipids, sex-steroid hormones, and β -amyloid peptide [8]. However, information concerning its physiological role is still lacking. ABCB1 could have a role in cell-mediated cytotoxicity, immunity and inflammation [1]. Several facts also support a role for ABCB1 in cholesterol homeostasis. First, cholesterol has a regulatory role in ABCB1 expression and activity [9-11]. Second, ABCB1 is located in membrane microdomains that are rich in lipids [12]. Third, *in vitro* and *ex vivo* experiments showed that ABCB1 could redistribute cholesterol from the inner leaflet of the membrane to the outer leaflet [10] or from the membrane to the endoplasmic reticulum [13] enhancing cholesterol esterification [14]. Finally, ABCB1 could be implicated in the intestinal cholesterol reabsorption and susceptibility to atherosclerosis [15].

ABCB1 is a highly polymorphic gene. Numerous single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been associated with altered ABCB1 expression and/or activity; changes in drug pharmacokinetics and treatment outcome; and in susceptibility to some diseases [7, 16, 17]. Despite ABCB1 is well studied in drug pharmacokinetics, little is known about *ABCB1* polymorphisms physiologic effects in healthy humans. While studying response to statin depending on *ABCB1* genotype, Rodrigues and collaborators observed that before treatment, hyperlipemic carriers of haplotype 2677T-3435T had higher basal serum total cholesterol and LDL cholesterol (LDLc) [18]. These authors proposed that modification of ABCB1 activity by different variants could lead to modification of cholesterol synthesis, esterification and uptake or could alter free cholesterol bioavailability for ABCA1 efflux [18]. Thus, we have explored the effects of 8 *ABCB1* polymorphisms in the genetic variability of lipid constituents in healthy individuals. We have selected 3 untranslated polymorphisms, namely T-129C, G-1A and T-76A; 2 silent variants, e.g. C1236T and C3435T; and 3 non-synonymous polymorphisms, namely A61G, G1199A and the triallelic polymorphism G2677T/A. These

SNPs are in linkage disequilibrium (LD). Since several studies proposed that haplotypes would be more informative than a single polymorphism [7], we have also considered haplotypes in this study.

2. Subjects and methods

(a) Subjects

A population of 371 subjects has been studied. These individuals belong to 85 families of the Stanislas Cohort, a longitudinal study, which included 1006 French families presumed to be healthy at the time of recruitment [19]. The first examination corresponds to the time of recruitment (1993-1995). The second health screening was conducted five years later. All subjects gave their written informed consent to participate in the Stanislas Cohort, which was approved by the Local Ethics Committee of Nancy, France. For this study, we have considered individuals for whom data were available at the second examination and who do not undergo drug therapy that could interfere with our tests e.g. cardiovascular, hypolipemic and antidiabetic drugs.

(b) Biochemical analyses

Plasma levels of total cholesterol and triglycerides were assayed using enzymatic methods (AU640, Olympus). Apolipoproteins were obtained by immunonephelometric (BNII, Dade Behring, ApoA1 and ApoB) or turbidimetric (Cobas-Mira, Roche Diagnostics, ApoC3 and ApoE) assays. HDLc was measured after precipitation of apolipoprotein B-containing

lipoproteins by sodium phosphotungstate/magnesium chloride reagent (Cobas-Mira, Roche Diagnostics) and LDLc was calculated by the Friedwald formula.

(c) Genotyping

Genotyping was described elsewhere [20]. Briefly, genomic DNA was extracted from EDTA-blood samples based on the Miller's protocol. Genotypes of each individual for T-129C (rs3213619), G1199A (rs2229109), C1236T (rs1128503), G2677T/A (rs2032582) and C3435T (rs1045642) were determined by PCR-RFLP assays. As concern G-1A (rs2214102), A61G (rs9282564) and T-76A (rs1922242), genotyping was performed using TaqMan ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System and Pre-Made TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems).

(d) Statistical analysis

Hardy-Weinberg equilibrium was tested in the parental population by a χ^2 test. Linkage disequilibrium and haplotype frequencies were estimated by the THESIAS program, a maximum-likelihood method for haplotype-based association analysis [21] which also permits to estimate haplotypic effect on lipids by comparison with the reference haplotype.

Statistical analyses were performed using SAS software version 9.1 (SAS Institute Inc.). Since individuals within a family are not independent, statistical analyses were based on the estimating equation technique by using the SAS GENMOD procedure with a repeated statement. Gender, age, generation, tobacco consumption, Body Mass Index (BMI), oral contraceptives and substitutive hormone therapy for women were included as covariates in the model. Student's test was used to estimate the relationship between the gender and quantitative variables and χ^2 analysis was used for categorical variables. For LDLc, HDLc,

triglycerides and apolipoproteins B, C3 and E, concentrations were logarithmically transformed because of skewed distributions.

If the number of homozygous subjects for an allele was lesser than five, heterozygotes and homozygotes for the less frequent allele were pooled together for the analysis. We have considered 4 models: allelic (all), dominant (dom), co-dominant (cod) and recessive (rec). For all the models (allelic or non-allelic) we considered as statistically significant $p < 0.01$. When $0.01 < p < 0.05$, we considered the result as a trend. Finally, interactions between sex and genotypes on lipid concentrations were tested with adjustment for age, hormones, BMI, smoking status, genotype and gender.

3. Results

Demographic and key clinical characteristics

Demographic and key clinical characteristics of the population sample are shown in **Table 1**. The population is composed of 104 fathers, 123 mothers, 79 sons and 65 daughters. The mean age of the population is 36.4 years. Among offspring, 48 sons and 37 daughters are less than 18 years ($m = 17 \pm 3$ years).

Allele frequencies

Distributions of variants in parents agree with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium. Genotype frequencies obtained for this population are listed in **Table 2**. At the 2677 position, only 1 individual was homozygous AA, 12 heterozygous GA and 7 heterozygous TA. So, the mutated alleles A and T were pooled together as a “W” allele. Frequencies of the variant allele for T-129C, G-1A, A61G, G1199A, C1236T, T-76A,

G2677W and C3435T are 0.04, 0.08, 0.09, 0.06, 0.41, 0.46, 0.44 and 0.46 respectively (**Table 2**). To note, these frequencies do not differ from those observed in the sample restricted to the parents and are similar to those observed in other European populations (described elsewhere in [20]).

Association of genotypes with lipid concentrations

The most relevant result is the association of C3435T variant with increased ApoA1 levels (**Fig. 1**). In the global population, ApoA1 values are respectively 1.61 ± 0.03 mmol/L, 1.64 ± 0.02 and 1.72 ± 0.03 mmol/L for CC, CT and TT carriers [$p_{cod}=0.005$]. In women, the mutated allele is also significantly associated with higher ApoA1 levels [$p_{cod}=0.009$]. Finally, men carriers of at least one mutated allele also tend to have higher ApoA1 levels (CC: 1.45 ± 0.02 , CT: 1.53 ± 0.02 and TT: 1.55 ± 0.03 mmol/L [$p_{cod}=0.05$, $p_{all}=0.02$]).

Other correlations are observed but limited to women. Hence, in an allelic model, values of some pro-atherogenic molecules are significantly modulated by T-76A and C1236T and tend to be modulated by G-1A and G2677W (**Fig. 2 and 3**). Women carrying -76A have higher concentrations of total cholesterol (TT: 5.03 ± 0.13 , TA: 5.59 ± 0.09 and AA: 5.55 ± 0.15 ; [$p_{all}=0.004$]) and ApoB (TT: 0.82 (0.79-0.85), TA: 0.95 (0.93-0.97) and AA: 0.96 (0.93-1.00); [$p_{all}=0.002$]) (**Fig. 2A**). In addition, they tend to have higher LDLc (TT: 2.75 (2.63-2.87), TA: 3.27 (3.19-3.35) and AA: 3.15 (3.00-3.30); [$p_{all}=0.02$]), ApoC3 (TT: 75.3 (71.6-79.1), TA: 84.5 (81.4-87.7) and AA: 89.7 (83.8-96.0) [$p_{all}=0.04$]) and triglycerides (TT: 0.86 (0.80-0.92), TA: 0.96 (0.92-1.01) and AA: 1.05 (0.96-1.14) [$p_{all}=0.05$]) concentrations (**Fig. 2A**). Women that carry the 1236T variant have significantly lower total cholesterol (CC: 5.58 ± 0.10 , CT: 5.46 ± 0.10 and TT: 4.99 ± 0.18 ; [$p_{all}=0.01$]). There is also a trend for lower ApoB (CC: 0.95 (0.92-0.98), CT: 0.93 (0.90-0.95) and TT: 0.80 (0.77-0.84); [$p_{all}=0.02$]) and

LDLc in these individuals (CC: 3.20 (3.09-3.30), CT: 3.19 (3.11-3.28) and TT: 2.63 (2.48-2.79); $p=0.03$) (**Fig. 2B**).

Compared to women homozygous for the wild-type allele at position G-1A (n=156), women that carry one mutated allele (n=31) would have more total cholesterol (5.78 ± 0.15 versus 5.34 ± 0.09 ; $p=0.02$), LDLc (3.40 (3.26-3.55) versus 3.03 (2.95-3.11); $p=0.03$) and ApoB (0.99 (0.95-1.03) versus 0.90 (0.88-0.92); $p=0.04$) (**Fig. 3A**). In addition, women carrying the 2677W variant tend to have lower values of ApoB (GG: 0.95 (0.92-0.98), GW: 0.92 (0.90-0.95) and WW: 0.83 (0.79-0.87); [$p=0.04$]), ApoC3 (GG: 89.8 (86.0-93.8, GW: 80.1 (76.6-83.6) and WW: 78.9 (75.1-82.9) [$p=0.05$]), LDLc (GG: 3.21 (3.10-3.32), GW: 3.15 (3.08-3.23) and WW: 2.74 (2.58-2.91); $p=0.05$) and total cholesterol (GG: 5.58 ± 0.11 , GW: 5.44 ± 0.09 and WW: 5.11 ± 0.20 ; [$p=0.06$]) (**Fig. 3B**).

Finally, no significant association was found for T-129C, A61G or G1199A.

Genotype*gender interactions

Given the observations made, we have examined the interactions between genotypes and the gender on the determination of lipids concentrations. As expected, no interaction was observed between gender and C3435T but when considering determinants of cholesterol, ApoB and LDLc levels, there were significant interactions between gender and T-76A ($p<0.003$), C1236T ($p<0.004$), G2677W ($p<0.04$) and G-1A ($p<0.01$).

Association of haplotypes with lipid concentrations

As previously shown in our parental population, the 8 SNPs are in moderate to strong linkage disequilibrium with each other [20]. As considered the associations observed with single SNPs analysis, haplotypes analysis was restricted to G-1A, C1236T, T-76A, G2677W and C3435T polymorphisms. C1236T is in strong negative LD with T-76A, in strong positive

LD with G2677W and in moderate positive LD with C3435T. In addition G-1A is in total positive LD with T-76A and in total negative LD with C1236T and G2677W. Based on these 5 SNPs, 15 haplotypes were observed in our parental population. Ten had a frequency higher than 1% (**Supplementary Table 1**). The most frequent, GTTWT (0.34), was considered as the reference haplotype. Correlation tests between these ten haplotypes and total cholesterol, LDL cholesterol, ApoB and ApoC3 showed no haplotypic effect. As concern ApoA1, there is a significant difference between the non-haplotypic model and the haplotypic model ($p=0.009$). GCAGC is significantly associated with lower ApoA1 concentrations compared to GTTWT ($p=0.002$) (**Supplementary Table 1**). In addition, haplotypes restricted to G2677W and C3435T polymorphisms exclusively would be as much informative with GC carriers having less ApoA1 than WT carriers ($p=0.05$).

4. Discussion

We showed here that mutated alleles for the positions 3435, 1236, and probably 2677, are associated with a favourable lipid profile while -76A, and maybe -1A, would be associated with an unfavourable one (e.g. higher pro atherogenic lipid values). As concern G2677W and G-1A, association results are only trend. We propose that they would either be significant in a bigger study or that these trends would only reflect effect of SNPs in LD with them. We did not determine it in this population due to an insufficient number of women carrying each haplotype. We have however analysed, in the entire population, associations between haplotypes obtained with these 5 SNPs and lipid values. Haplotype result is essentially consistent with the single SNP association at C3435T. Indeed, we observed that GCAGC is significantly associated with lower ApoA1 concentrations than GTTWT

haplotype. In addition, restriction of haplotypes to SNPs G2677W and C3435T would be as much informative.

The molecular mechanism underlying C3435T activity is not well understood. Since C3435T is a synonymous polymorphism, some authors suggest that C3435T effect would be attributable to another SNP that is in LD with it, such as G2677T/A [7]. However, it is assumed that C3435T is associated with a lower transport activity of ABCB1 [16]. In addition, we showed here that these polymorphisms have different effects on lipid levels and that those associations are stronger with C3435T. C3435T might alter mRNA stability [22] or alter the structure of substrate and inhibitor interaction site [23]. C1236T is also a silent mutation which effect is not clearly determined. There are several possible explanations for its observed activity including linkage disequilibrium with another functional SNP or effect on splicing, processing or translational control and regulation. The substitution G to T or A at position 2677 is responsible for the substitution of the hydrophobic Alanine to the hydrophilic Serine or Threonine respectively [16]. The variation G-1A is located at the nucleotide that directly precedes the ATG translation start codon [24] and could thus affect translation. Finally, little is known about T-76A polymorphism, except that it is located in intron 16 close to exon boundaries [24].

To our knowledge, we are the first to report significant associations of ABCB1 genotypes with lipid concentrations in healthy individuals. However, previous studies support the hypothesis that *ABCB1* genotypes can directly modulate lipid homeostasis.

Alonso-Villaverde et al. [25] reported that after efavirenz treatment, 3435 CT and CC carriers respectively had an increase of 11.8% and 36.5% in HDLc levels compared to no significant elevation in TT carriers. This association between C3435T polymorphism and modification in HDLc elevation could be explained by a variation in drug plasma and tissue levels secondary

to a variation in ABCB1 expression. However, these authors interestingly hypothesized a direct relationship between C3435T genotype and HDLc concentration. Efavirenz would induce overexpression of ABCB1 and by this way it would increase the reverse transport of cholesterol and the HDLc concentrations. However, since TT genotype would be associated with lower P-gp activity, it would counterbalance the activation by efavirenz resulting in no variation of HDLc concentration. Two other studies report association of *ABCB1* SNPs and lipid levels in hypercholesterolemic patients before starting statin treatment. Kajinami et al. [26] reported that before treatment initiation, hypercholesterolemic women carrying at least one mutated allele for G2677W present significantly higher LDLc than non-carriers and tend to have higher total cholesterol. Concordant with Kajinami and colleagues, Rodrigues et al. [18] showed that 2677T-3435T haplotype hypercholesterolemic carriers present higher basal LDLc and total cholesterol. Direct effect of *ABCB1* genotypes on lipid concentration might interfere with the modulation of response to statins by these polymorphisms. Rodrigues and collaborators suggest that these high levels of serum total and LDLc may be due to an increased ABCB1 mRNA and protein expression. The variations of lipid concentrations that we observed are in the opposite direction to those observed by Kajinami et al. and Rodrigues et al. Explanation might be in the size of the groups and mostly in the composition of the population: hyperlipidemic *versus* healthy subjects. Indeed, lipids are both substrates and modulators of ABCB1 and variation of cholesterol concentration could modulate transporter activity [12].

In our study, associations were observed mainly in women, which was confirmed by interaction tests. This sex-dependent effect was previously reported by Kajinami et al. [26]. According to these authors, a possible explanation is the modulation of P-gp activity by sex

hormones such as progesterone. Indeed, *in vitro* experiments have suggested that progesterone has a specific binding-site on P-gp, resulting in a modulation of transporter activity [27].

Our data do not allow any conclusion as to the mechanisms by which lipid levels are modulated by *ABCB1* genotypes. The role of *ABCB1* in cholesterol transport is actually a controversial issue. To date, most of the studies were conducted *in vitro* and we lack of *in vivo* studies on involvement of *ABCB1* on absorption, distribution and metabolism of cholesterol. However, it seems likely that *ABCB1* plays that role and several points support this assumption.

ABCB1 is a cholesterol-responsive-gene located in lipid-rich membrane microdomains [9]. It was observed both in rafts and caveolae, which are membrane microdomains rich in lipids, especially cholesterol and sphingolipids, and in non-raft domains [9]. In addition, the lipid composition, notably in cholesterol, in the environment of *ABCB1* can influence its localization, its expression and its activities [6, 9, 10, 12, 28].

Many studies have suggested a direct role for *ABCB1* in cholesterol transport. Thus, *ABCB1* was implicated in intestinal cholesterol reabsorption [15] in mice. In addition, *in vitro* experiments showed that *ABCB1* could redistribute free cholesterol from the inner to the outer leaflet of the membrane [10] or from the membrane to the endoplasmic reticulum [13] enhancing cholesterol esterification [14].

For some authors, *ABCB1* would act as a floppase to redistribute cholesterol from the inner leaflet of the membrane to the outer leaflet [9, 10]. Thereby *ABCB1* could participate to the cholesterol enrichment in the rafts and the caveolae and to the regulation of physiological functions of these domains [10]. In addition to this local lipid translocation at the membrane, *ABCB1* could also modulate the different steps of whole cholesterol trafficking such as cholesterol endogenous biosynthesis, cholesterol esterification in the endoplasmic reticulum,

exogenic cholesterol import from LDL and export to HDL [9, 10]. This could be part of an explanation of our results. Indeed ApoA1 is the major apolipoprotein in the HDL. If ABCB1 allows the efflux of cholesterol from the cells to the HDL, and if *ABCB1* polymorphisms modify the expression and the activity of the transporter, then it is conceivable that *ABCB1* polymorphisms are associated with ApoA1 plasma levels.

Other authors proposed that ABCB1 might transport cholesterol from the membrane to the endoplasmic reticulum hence promoting cholesterol esterification by ACAT. Debry and collaborators first showed in cultured cell lines that MDR inhibitors inhibit specifically the esterification of cholesterol derived from the plasma membrane [29]. Luker et al. [11] showed that within a given cell type, greater expression of ABCB1 was correlated with increased esterification of plasma membrane cholesterol. Batetta et al. observed a correlation between MDR1 mRNA and level of cholesteryl esters with higher levels of cholesteryl esters, ACAT and MDR1 mRNAs and lower levels of caveolin-1 mRNA in atherosclerotic segments of arterial vascular walls [14]. To explain the higher levels of total and LDL cholesterol observed in 2677T-3435T hypercholesteroleemics, Rodrigues et al. proposed that the increased ABCB1 activity associated with *ABCB1* variants may result in increased intracellular content of cholesterol esters that induces a reduction of cholesterol synthesis and LDL uptake mediated by HMGR and LDL receptor, respectively [18]. Therefore, the lower number of LDL receptors on the cell membrane reduces the rate of removal of LDL particles, enhancing the cholesterolemia. Our results are contradictory to Rodrigues et al. but their reasoning is applicable to our results if we consider that these variants would decrease rather than increase ABCB1 activity [24].

Our study on association of *ABCB1* SNPs and blood lipids was conducted in a small number of healthy individuals (n=371) and it would be of interest to conduct a replication study. We have looked for consistency of our results with recent genome wide scans from the literature.

ABCB1 SNPs are not mentioned among newly identified SNPs associated with blood apolipoproteins and lipids in wide genome association studies such as those from Kathiresan et al. [30]. However, these studies only report for the most significant associations with really small p-values and data on less significant associations are not available for us to date.

In conclusion, *ABCB1* SNPs could modulate lipid and lipoprotein levels in healthy subjects. In particular, 3435T was associated with higher ApoA1 levels in the entire population and – 76A with higher cholesterol and ApoB plasma values in women exclusively. These results support a physiologic role for *ABCB1* in lipid homeostasis but the underlying mechanisms still remain to be determined.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the families of the STANISLAS survey and the staff of the Centre for Preventive Medicine for their involvement. The STANISLAS cohort study is supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladie 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 the Henri Poincaré University of Nancy, Abbott, Bayer-Pharma, Beckman Coulter, Dade-Behring, Daiichi, Randox, and Roche. This work was supported in part by the Bayerisch-Französisches Hochschulzentrum (BFHZ). We also thank Dagmar Richter, Michèle Pfister, Christine Masson and Suzanne Droesch for their technical support.

References

- [1] Efferth T. Adenosine triphosphate-binding cassette transporter genes in ageing and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2003;2:11-24.
- [2] van Meer G, Halter D, Sprong H, et al. ABC lipid transporters: extruders, flippases, or floppase activators? *FEBS Lett* 2006;580:1171-7.
- [3] Oram JF, Vaughan AM. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res* 2006;99:1031-43.
- [4] Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, et al. Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J Clin Invest* 2004;114:1343-53.
- [5] Schmitz G, Langmann T, Heimerl S. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J Lipid Res* 2001;42:1513-20.
- [6] Klucken J, Buchler C, Orso E, et al. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:817-22.
- [7] Marzolini C, Paus E, Buclin T, et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:13-33.
- [8] Siest G, Marteau JB, Maumus S, et al. Pharmacogenomics and cardiovascular drugs: need for integrated biological system with phenotypes and proteomic markers. *Eur J Pharmacol* 2005;527:1-22.
- [9] Orłowski S, Martin S, Escargueil A. P-glycoprotein and 'lipid rafts': some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?). *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1038-59.

- [10] Garrigues A, Escargueil AE, Orłowski S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10347-52.
- [11] Luker GD, Pica CM, Kumar AS, et al. Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains. *Biochemistry* 2000;39:7651-61.
- [12] Troost J, Albermann N, Emil Haefeli W, et al. Cholesterol modulates P-glycoprotein activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:705-11.
- [13] Luker GD, Nilsson KR, Covey DF, et al. Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol. *J Biol Chem* 1999;274:6979-91.
- [14] Batetta B, Mulas MF, Petruzzo P, et al. Opposite pattern of MDR1 and caveolin-1 gene expression in human atherosclerotic lesions and proliferating human smooth muscle cells. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1113-20.
- [15] Tous M, Ribas V, Ferre N, et al. Turpentine-induced inflammation reduces the hepatic expression of the multiple drug resistance gene, the plasma cholesterol concentration and the development of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2005;1733:192-8.
- [16] Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 2006;112:457-73.
- [17] Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, et al. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J* 2007;7:154-79.

- [18] Rodrigues AC, Rebecchi IM, Bertolami MC, et al. High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with MDR1 haplotypes in Brazilian hypercholesterolemic individuals of European descent. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1389-97.
- [19] Siest G, Visvikis S, Herbeth B, 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.
- [20] Jeannesson E, Albertini L, Siest G, et al. Determination of ABCB1 polymorphisms and haplotypes frequencies in a French population. *Fundam Clin Pharmacol* 2007;21:411-8.
- [21] Tregouet DA, Barbaux S, Escolano S, et al. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 2002;11:2015-23.
- [22] Wang D, Johnson AD, Papp AC, et al. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:693-704.
- [23] Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007;315:525-8.
- [24] Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3473-8.
- [25] Alonso-Villaverde C, Coll B, Gomez F, et al. The efavirenz-induced increase in HDL-cholesterol is influenced by the multidrug resistance gene 1 C3435T polymorphism. *AIDS* 2005;19:341-2.

- [26] Kajinami K, Brousseau ME, Ordovas JM, et al. Polymorphisms in the multidrug resistance-1 (MDR1) gene influence the response to atorvastatin treatment in a gender-specific manner. *Am J Cardiol* 2004;93:1046-50.
- [27] Shapiro AB, Fox K, Lam P, et al. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur J Biochem* 1999;259:841-50.
- [28] Gayet L, Dayan G, Barakat S, et al. Control of P-glycoprotein activity by membrane cholesterol amounts and their relation to multidrug resistance in human CEM leukemia cells. *Biochemistry* 2005;44:4499-509.
- [29] Debry P, Nash EA, Neklason DW, et al. Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol esterification. *J Biol Chem* 1997;272:1026-31.
- [30] Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet* 2008;40:189-97.

TABLES

TABLE 1. Characteristics of the studied population (values are expressed as mean \pm SD or percentage)

Characteristics	Males (n=183)	Females (n=188)	p	All (n=371)
Age (years)	33.2 \pm 14.6	34.6 \pm 13.3	0.64	33.9 \pm 13.9
BMI (kg/m ²)	23.7 \pm 3.9	23.1 \pm 3.7	0.16	23.4 \pm 3.8
Current smokers (%)	26.4	17.2	0.03	21.7
Oral contraceptives (%)	-	18.6	-	
HRT (%)	-	12.2	-	
Total Cholesterol (mmol/L)	5.21 \pm 1.21	5.38 \pm 1.04	0.15	5.30 \pm 1.13
Triglycerides (mmol/L) ^a	1.17 \pm 0.68	1.01 \pm 0.48	0.025	1.09 \pm 0.59
LDLc (mmol/L) ^a	3.20 \pm 1.08	3.20 \pm 0.92	0.63	3.20 \pm 0.92
HDLc (mmol/L) ^a	1.47 \pm 0.38	1.72 \pm 0.39	<0.0001	1.72 \pm 0.39
ApoB (mmol/L) ^a	0.92 \pm 0.29	0.92 \pm 0.23	0.46	0.92 \pm 0.26
ApoA1 (mmol/L)	1.51 \pm 0.195	1.65 \pm 0.27	<0.0001	1.58 \pm 0.24
apoC3 (mmol/L) ^{a, b}	88.5 \pm 32.3	85.3 \pm 28.2	0.39	86.9 \pm 30.3
ApoE (mmol/L) ^a	38.9 \pm 13.2	40.3 \pm 11.6	0.17	39.6 \pm 12.4

BMI Body Mass Index; HRT Hormone Replacement Therapy

^a In order to perform the Student's test, values are Ln transformed

^b There are missing values for ApoC3 (n=140 and 139 respectively)

TABLE 2: Genotype and allele frequencies in the studied population

Polymorphism	Genotype frequencies			Allele frequencies	
	TT	TC	CC	T	C
T-129C, exon 1b (^a rs3213619)	0.92 (n=338)	0.08 (n=31)	0.00 (n=0)	0.96	0.04
G-1A, intron 1 (rs2214102)	0.85 (n=312)	0.14 (n=53)	0.01 (n=4)	0.92	0.08
A61G, exon 2 (rs9282564)	0.84 (n=308)	0.15 (n=56)	0.01 (n=4)	0.91	0.09
G1199A, exon 11 (rs2229109)	0.885 (n=322)	0.11 (n=40)	0.005 (n=2)	0.94	0.06
C1236T, exon 12 (rs1128503)	0.34 (n=124)	0.50 (n=183)	0.16 (n=60)	0.59	0.41
T-76A intron 16 (rs1922242)	0.28 (n=104)	0.51 (n=190)	0.20 (n=75)	0.54	0.46
^b G2677W, exon 21 (rs2032582)	0.30 (n=111)	0.51 (n=190)	0.19 (n=69)	0.56	0.44
C3435T, exon 26 (rs1045642)	0.28 (n=102)	0.51 (n=185)	0.20 (n=73)	0.54	0.46

^a rs: reference sequence number according to NCBI database

^b “W”: T or A

Figure Captions

Fig. 1. ApoA1 levels depending on *ABCB1* C3435T genotypes.

Fig. 2. Plasma lipid and lipoprotein levels in women depending on *ABCB1* genotypes for A) T-76A and B) C1236T polymorphisms. Chol Cholesterol; TG Triglycerides.

Fig. 3. Plasma lipid and lipoprotein levels in women depending on *ABCB1* genotypes for A) G-1A and B) G2677W polymorphisms. Chol Cholesterol; TG Triglycerides.

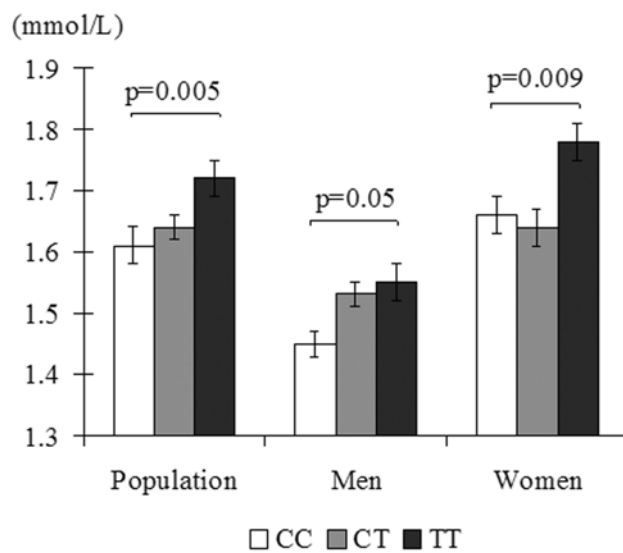


Figure 1

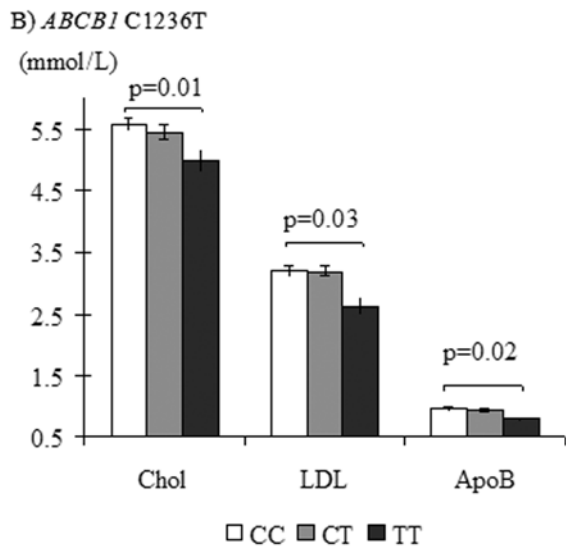
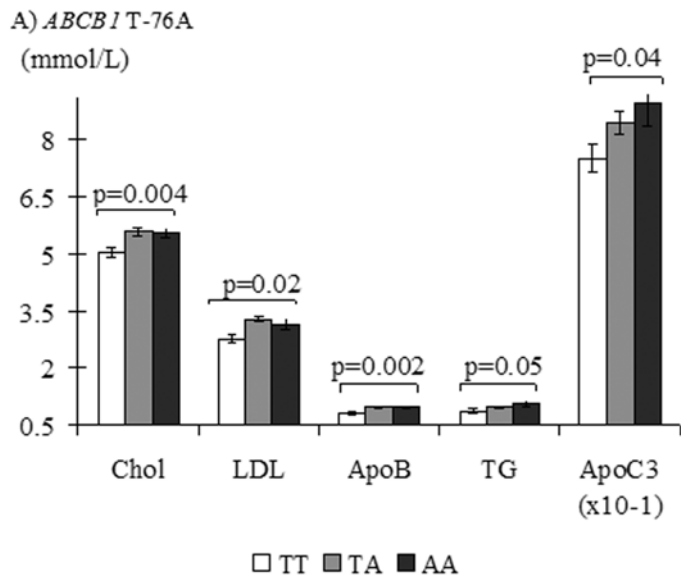


Figure 2

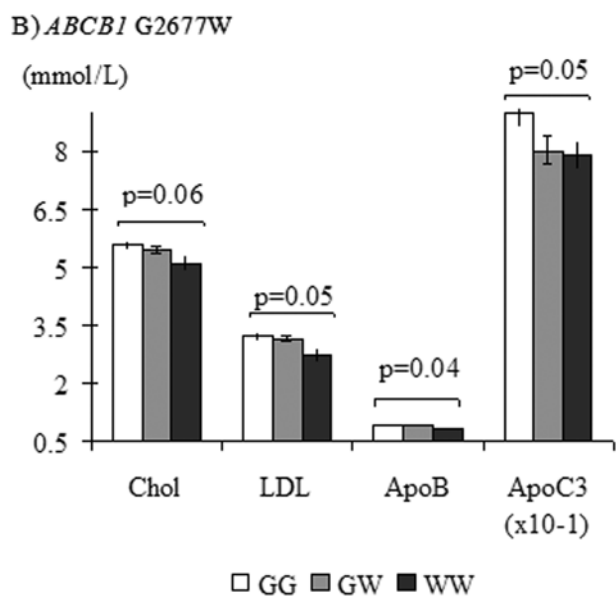
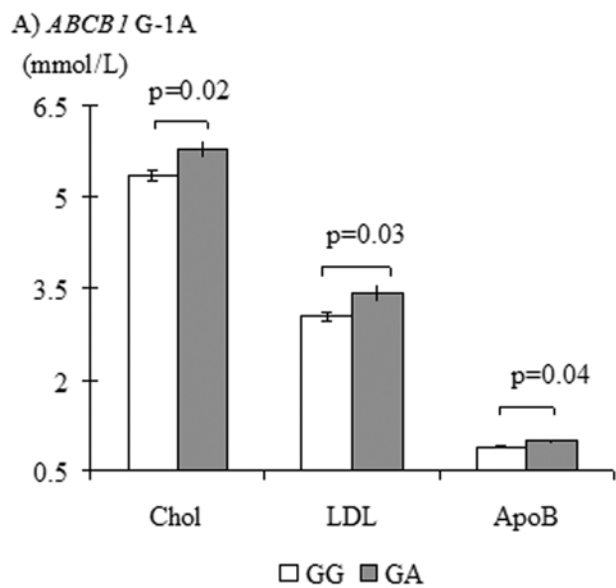


Figure 3

SUPPLEMENTARY TABLE 1. ApoA1 levels depending on haplotypes (based on G-1A, C1236T, T-76A, G2677W and C3435T polymorphisms; the most frequent haplotype is the reference one)

Haplotype	Frequency	beta	se	p
G T T W T	34.2%	0.81	0.12	ref
G C A G C	28.1%	-0.07	0.02	0.0023
G C T G C	10.7%	-0.03	0.04	0.40
G C A G T	7.6%	0.07	0.04	0.07
A C A G C	4.9%	0.02	0.05	0.66
G T T W C	4.9%	-0.04	0.07	0.57
G C A W C	2.6%	-0.05	0.06	0.45
G C A W T	1.7%	-0.02	0.14	0.86
G T T G C	1.5%	0.10	0.12	0.42
G T T G T	1.1%	00.15	0.14	0.30

ARTICLE 3

Transcription factors and drug metabolizing enzymes genes expression in lymphocytes from human healthy subjects.

Siest G, **Jeannesson E**, Marteau JB, Samara A, Marie B, Pfister M
and Visvikis-Siest S.

Drug Metabolism and Disposition. 2008 ; 36 (1):182-9

**RESUME
ARTICLE 4**

ABCB1 and PXR expressions in PBMCs are not associated with lipid and apolipoprotein concentrations in the Stanislas Cohort.

Jeannesson E, et al.

En cours de rédaction.

ABSTRACT

ABCB1 is a membrane transporter ubiquitously expressed including in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Resistance to drugs is associated with genetic variations of its gene and with modulation of its expression through the PXR transcription factor. Several facts also support a role for ABCB1 in cholesterol homeostasis. First, cholesterol has a regulatory role in ABCB1 expression and activity. Second, ABCB1 is located in lipid-rich membrane microdomains. Third, *in vitro* and *ex vivo* experiments showed that ABCB1 could redistribute cholesterol from the inner leaflet of the membrane to the outer leaflet or from the membrane to the endoplasmic reticulum enhancing cholesterol esterification. Finally, ABCB1 would be implicated in the intestinal cholesterol reabsorption.

We have previously shown that ABCB1 SNPs can modulate blood lipid and apolipoprotein concentrations in healthy subjects. We wanted here to investigate if ABCB1 expression profile in PBMCs would also be related to plasma lipid variability.

ABCB1 and PXR were measured by real time quantitative RTPCR in 83 subjects from the STANISLAS cohort. We showed that ABCB1 and PXR are both expressed in PBMCs of all healthy subjects. Interindividual variability of ABCB1 and PXR expression is respectively dependant from BMI and gender. Their expressions do not correlate. Finally, we didn't find association between ABCB1 or PXR expression in PBMCs and lipid plasma concentrations in this subset of healthy subjects. However, it would be of interest to reproduce this study in PBMCs of people at high cardiovascular risk or in an *in vitro* model of PBMCs with induction studies of ABCB1 expression.

Keywords: ABCB1, PXR, lipids, polymorphisms, expression, PBMCs.

ARTICLE 5

Genetic profiling of human cell lines used as in vitro model in cardiovascular pathophysiology and pharmacotoxicology.

Jeannesson E, Siest G, Zaiou M, Berrahmoune H, Masson S and Visvikis-Siest S.

Cell Biology and Toxicology. En révision.

Genetic profiling of human cell lines used as in vitro model to study cardiovascular pathophysiology and pharmacotoxicology

Elise Jeannesson ^{a,b}, Gérard Siest ^{a,b,*}, Mohamed Zaiou ^{a,b}, Hind Berrahmoune ^a, Christine Masson ^{a,b} and Sophie Visvikis-Siest ^a

^a INSERM, CIC 9501, Equipe Génétique Cardiovasculaire, Nancy, F-54000, France.

^b Nancy-Université, Faculté de Pharmacie, Nancy, F-54000, France.

* Corresponding author:

Pr Gérard Siest

Faculté de Pharmacie

INSERM-CIC 9501

Equipe Inserm Génétique Cardiovasculaire

30 rue Lionnois

54000 Nancy - France

Tél. 33 (0)3 83682170

Fax. 33 (0)3 83321322

E-mail : gerard.siest@pharma.uhp-nancy.fr

ABSTRACT

Background. Several cell lines are used to monitor drug pharmacokinetics and pharmacodynamics and to investigate a number of biochemical mechanisms. However, little is known about the genetic profile of these in vitro models.

Objectives. To analyze genetic profile of Thp1, U937, HL60, K562, HepG2, Kyn2 and Caco2 human cell lines with a focus on genetic variations within genes involved in the development of cardiovascular pathologies and with drug treatment response.

Methods. Multiplex-PCR, PCR-RFLP and TaqMan assays were used to genotype 120 polymorphisms within 68 genes previously shown to be involved in various processes such as inflammation, lipid metabolism and blood pressure.

Results. We provide here a list of potential polymorphisms known to be associated with cardiovascular disease. Our results show that the seven cell lines carry several of these mutations within genes of interest. Only two examples will be given in this abstract. For instance, U937 cells are homozygous for *APOE* $\epsilon 4$, a mutant associated with higher susceptibility to cardiovascular diseases and to lower response to statins. Our study showed that deletion in intron 16 of the *ACE* gene, which is associated with susceptibility to hypertension and to variation of response to ACE inhibitors, can be found in all considered cells but Kyn2 cells.

Conclusion. We provide here a data bank of different cell lines genetic profile. In our opinion, this useful information may bring insight into the design and choice of an adequate in vitro model and may help to explain mysterious discrepancies in data from different laboratories.

Keywords: cardiovascular system; cell lines; genetic profiles; pharmacotoxicology, pathophysiology.

INTRODUCTION

Human cell lines represent a good tool to model numerous pathophysiological and pharmacotoxicological processes such as those associated with cardiovascular diseases. They permit biochemical characterization of a number of pathways, in conditions resembling physiologic or pathologic conditions (Brahimi et al, 2001; Fach et al, 2004; Riou et al, 2007). Cell lines also help to study a response to drugs by providing information on their efficacy, toxicity and mechanisms of action. Such information are important in determining the way a drug is degraded and how drug metabolism enzymes are modulated (Verstuyft et al, 2003; Maejima et al, 2004; Iwamoto et al, 2007).

Several human cell lines are now available including Thp1, U937, HepG2, HL60, K562, Kyn2 and Caco2 which are commonly used as in vitro models in different area of research. For instance, in the cardiovascular domain, Thp1 and U937 cell lines are used to study macrophages involvement in atherosclerosis development as well as in response to hypolipidemic drugs (Argmann et al, 2005). These cells are frequently used to identify potential biomarker candidate molecules for atherosclerosis (Yu et al, 2003; Fach et al, 2004). On the other hand, myeloid leukemia cell lines, HL60 and K562, are used to determine expression profile of drug metabolizing enzymes in human blood cells (Nagai et al, 2002). Hepatic HepG2 and Kyn2 cells are also utilized to study lipid metabolism and drugs effect (Brahimi et al, 2001; Maejima et al, 2004; Brandon et al, 2006). Regarding Caco2 cell line, it has been shown to be useful model to study metabolism and transport of a number of drugs (Brandon et al, 2006).

Genetic polymorphisms known to influence expression of genes involved in the cardiovascular domain may exist in these cells and may influence a number of parameters. Recently, the genetic profile of IGROV1, LS180, HepG2 and Caco2 cell lines was reported for drug metabolizing enzyme and drug transporter genes (Brandon et al, 2006). However, the profile of the other cell lines remains to be established for candidate genes. We thought it will be of interest to determine, in certain human cell lines, genetic variation within genes involved in cardiovascular metabolism pathways and in response to drug treatment of these diseases. In this context, and in collaboration with Roche Molecular Systems, a panel of genes and their known polymorphisms were selected for this study based on the literature (Cheng et al, 1998; Cheng et al, 1999; Hoppe et al, 2004). The choice of these genes was done 1) upon

their likelihood to contribute to the development and progression of cardiovascular diseases. 2) On the belief that they may be potential genetic markers that predict these multifactorial diseases. 3) They have high frequency in the general population (Cheng et al, 1998; Cheng et al, 1999; Hoppe et al, 2004). Thus, we have retained 120 polymorphisms of 68 genes involved in lipid metabolism, blood pressure regulation, inflammation, cellular adhesion, immune system, cell growth, thrombosis, homocysteine metabolism, oxidative stress and transcription. Data obtained from this study may bring insight into a better use of cell lines as a model particularly in the cardiovascular area of research.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and reagents

Thp1, U937, K562, HepG2 and Caco2 cell lines were obtained from ATCC (LGC Promochem, Molsheim, France). HL60 cells were obtained from ECACC (Sophia-Antipolis, France). Kyn2 cell line was a gift from Dr M Kojiro laboratory (Japan). Cell culture media were purchased from Gibco-Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Fetal calf serum (FCS) was obtained from BioWest (Nuaille, France) and other supplements were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin, France). Routine cell culture was performed following ATCC recommendations. Non-adherent Thp1, U937, HL60 and K562 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with L-glutamine, 10% (v/v) heat-inactivated FCS, penicillin, streptomycin and amphotericin B. In addition, sodium pyruvate, HEPES and D glucose were added to Thp1 and U937 media. β -mercaptoethanol was also added to Thp1 cells medium. Culture of HepG2 and Caco2 monolayer cells was performed in MEM medium with Earl's salts supplemented with L-glutamine, sodium pyruvate, non essential amino-acids, penicillin, streptomycin and amphotericin B and either 10% FCS for HepG2 cells or 20% for Caco2 cells. Finally, Kyn2 cells were grown in DMEM with glucose and L-glutamine, 10% FCS, penicillin, streptomycin and amphotericin B. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂; 95% air atmosphere. Floating cells were subcultured every two to three days and adherent cells once to twice a week.

DNA isolation

Genomic DNA was extracted from cultured cells using a salting out method as described previously (Miller et al, 1988).

Genotyping

For genetic profiling of cell lines, 68 genes listed in Table 1 were selected in this study. Genes were named according to their official symbol (Entrez Gene). In a supplementary table, we summarized the chromosomal localization, tissue where these genes are expressed and disorders associated with their genetic variations (**Supplementary table 1**).

Table 1: Selected genes potentially involved in different pathways of cardiovascular diseases.

For polymorphism presentation, wild-type allele is presented in capital letters while mutated allele is designated as small letters (three letters for an amino-acid and only one letter for a nucleotide).

Genotyping of cell lines was performed using three methods: multilocus genotyping assay, PCR-RFLP and TaqMan technology. Most of the studied polymorphisms were determined using multilocus genotyping assays already described elsewhere (Cheng et al, 1999; Hoppe et al, 2001). The *ATP-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1)* gene polymorphisms: T-129c, G1199a, C1236t, G2677t/a and C3435t, were genotyped by PCR-RFLP method as previously described (Jeannesson et al, 2007). Finally, G-1a, A61g and T-76a loci in *ABCB1* gene; ARG219lys, ARG1587lys, ILE883met, C-7t, G-395c and C-564t in *ABCA1*; and CYS54tyr, THR400lys and ALA632val in *ABCG8* were genotyped using the TaqMan ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System and the Pre-Made TaqMan_SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) (Jeannesson et al, 2007).

RESULTS

This study was designed to analyze genetic profile of various cell lines with regard to genes of the cardiovascular system. 120 polymorphisms were investigated in Thp1, U937, HepG2, HL60, K562, Kyn2 and Caco2 human cell lines.

Our results showed that all cell lines studied here were homozygous for the wild type allele at the following 29 loci: *CCR3* PRO39leu, *CCR5* WT/del32 (wt/Δ580-611), *TNFA* G-308a, *ICAM1* LYS56met, *ICAM1* GLY241arg, *SELE* SER128arg, *SELE* LEU554phe, *CTLA4* C-318t, *MS4A2* GLU237gly, *ABCB1* T-129c, *ABCB1* G-1A, *ABCB1* G1199a, *APOA4* GLN360his, *APOB* ARG3500gln, *APOC3* C3175g, *CETP* ASP442gly, *CETP* G(+1)a, *LPL* T-93g, *LPL* ASP9asn, *LPL* ASN291ser, *ADRB2* THR164ile, *SCNNIA* TRP493arg, *NOS3* C-690t, *FII* G20210a, *FV* ARG506gln, *FVII* (-)323 10bp del/ins, *FVII* ARG353gln, *PPARG* PRO12ala and *TCF7* PRO19thr. To avoid ambiguity in terms of variants designation, reference SNP (rs) identification number and biological impact associated with each mutated allele are summarized in the **Supplementary table 2**.

91 out of the 120 polymorphisms studied here were found in at least one of the seven cell lines tested in this investigation. Genotyping data obtained using PCR-RFLP, TaqMan technology and multilocus genotyping assays as well as frequencies of these polymorphisms in Caucasians and the biological impact associated with the variant allele are summarized in **Supplementary tables 3 to 6**.

Genetic profile of genes associated with inflammation, cellular adhesion, growth factors and immune system in studied cell lines

Most of inflammatory genes described here are polymorphic (**Supplementary Table 3**). For instance, the mutation 62ile of the chemokine receptor gene *CCR2*, which is associated with reduced atherosclerosis susceptibility (Pai et al, 2006), is found in Thp1, HL60, HepG2 and Kyn2 cell lines. The variant -571a of *IL10* gene, which is associated with risk of coronary events (Trompet et al, 2007), is found in Thp1, HL60, HepG2 and Kyn2 cells. *IL4* -589t allele, a predictor of thromboembolic stroke (Zee et al, 2004), is present in Thp1, HepG2 and Kyn2 cells. Thp1 and Kyn2 are homozygous for *IL6* -572c whereas HL60, K562 and Caco2 cells carry the variant allele *IL6* -174c. While *IL6* -572c is associated with higher blood

pressure (Humphries et al, 2001), -174c allele is associated with a more favourable cardiovascular profile (Flex et al, 2004; Hamid et al, 2005). *TNFA* haplotype -244a/-238a was associated with higher risk of complication in type II diabetic patients (Shiau et al, 2003). In this study, we found that both HL60 and K562 cell lines carry such an unfavourable haplotype. *LTA* gene expression can be altered by two polymorphisms: A252g and THR26asn, leading to increase risk for myocardial infarction (Ozaki et al, 2002). Our study showed that Thp1 cell line is heterozygous for both polymorphisms of *LTA* gene.

While none of cell lines investigated here exhibited the known mutation in the adhesion molecule gene *ICAM1*; K562, HepG2 and Kyn2 cells were heterozygous for *VCAM* T-1594c polymorphism. In the same way, while no cells carry known mutations in *SELE* gene, Thp1, HL60, K562 and Kyn2 cell lines were heterozygous for *SELP* SER330asn mutation and Caco2 were homozygous for *SELP* 640leu variant. Finally, *MMP3* -1171A6 variant was observed in all cells but HL60 and Caco2. This study showed that only Thp1 cell line seems to carry mutated allele -509t of *TGFBI* growth factor gene, which is associated with increased risk of stroke (Sie et al, 2006). With regard to molecules of the immune system, each cell line is shown to be mutated for *C5* VAL802ile and *CTLA4* THR17ala; and Thp1, HL60, K562, HepG2 and Caco2 cells were mutated for *CD14* C-260t polymorphism.

Genetic profile of genes associated with lipid and lipoprotein metabolism

Apolipoprotein genes were found to be highly polymorphic (**Supplementary Table 4**). In this study, we showed that U937 cell line is the only one that carries *APOA4* THR347ser mutant allele. None of the studied cells here seems to carry the mutated allele of *APOB* gene at position 3500 probably due to the rare frequency of this allele. However, U937, K562 and HepG2 cells were homozygous for the mutated allele *APOB* 71ile, which is associated with higher concentrations of ApoB and LDL cholesterol (Pallaud et al, 2001). We also noticed that all the seven cell lines carry at least one mutated allele of *APOC3* gene, which is associated with higher triglycerides level (Xu et al, 1994; Pallaud et al, 2001; Lai et al, 2005). Finally, our study showed that U937 cell line carries an *APOE* ε4/ε4 genotype and it is known that ε4 allele is associated with a higher risk of cardiovascular disease (OMIM Database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>).

Alleles of lipid transporter genes, including *ABCA1* and *ABCG8* involved respectively in reverse transport of cholesterol and limitation of intestinal sterol absorption, were also

investigated. We found HepG2 to be the only cell line that carries mutated alleles of *ABCA1* ARG219lys and ILE883met which may be associated with a favourable lipid profile (Benton et al, 2007; Jensen et al, 2007). On the other hand, Caco2 cells carry the mutants 400lys and 54cys for *ABCG8*. HL60, HepG2 and Kyn2 cells are heterozygous for *ABCG8* TYR54cys. Both mutated variants were associated with a lower lipid response to dietary changes (Hubacek et al, 2004). ABCB1 transporter is well known for its role in the modulation of response to drug treatment (e. g. digoxin and statins) (Marzolini et al, 2004). Beside this role, ABCB1 might also be involved in lipid transport (Garrigues et al, 2002). *ABCB1* C1236t, G2677t/a and C3435t polymorphisms were reported to alter ABCB1 activities (Marzolini et al, 2004). While Thp1 and U937 cells were found here to carry these mutations, HepG2 cells were homozygous for the wild-type allele at the three loci and Caco2 cells were heterozygous for these polymorphisms.

Certain polymorphisms within *CETP* gene were associated with a lower activity of the corresponding protein and with higher plasma concentration of HDL cholesterol (Barzilai et al, 2003; Thompson et al, 2003) (OMIM Database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>). Our study demonstrated that Kyn2 cell line was wild-type homozygous for all the considered polymorphisms, while other cell lines exhibited at least one mutation within this gene.

Finally, we showed that Thp1 cells carry the following mutants: *LDLR* NcoI +/-, *LIPC* C-480t and *LPL* SER447ter. U937 and HL60 cell lines showed the variant allele for *LDLR* NcoI +/- and *LPA* C93t respectively. K562 cell line carries mutants for *LDLR* NcoI +/- and *LPL* SER447ter. HepG2 cells carry *LDLR* NcoI +/- and *LIPC* C-480t polymorphisms and Kyn2 cells present *LIPC* C-480t, *LPL* SER447ter and *LPA* C93t variants.

Genetic profile of genes associated with blood pressure in studied cell lines

Cells lines investigated here share also numerous genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system (**Supplementary Table 5**). It is known that the *ACE* gene has an insertion/deletion (I/D) polymorphism in intron 16 which consists of the absence or presence of a 287-base pair Alu sequence. The MET to thr change at position 235 of the angiotensinogen gene (*AGT* MET235thr) and the A to C transition at position 1166 of the angiotensin II type-1 receptor gene (*AGTR1* A1166c) were also described. All these polymorphisms are assumed to be associated with susceptibility to cardiovascular disease and

hypertension as well as with variation of response to ACE inhibitors (Baudin, 2002). Our study showed that deletion in intron 16 of the *ACE* gene can be found in all studied cell lines but Kyn2 cells. The variant at position 235 in *AGT* gene was found in all cells but U937. In addition, HepG2 and Caco2 cell lines were heterozygous for *AGT1R* A1166c.

Both Thp1 and Kyn2 cells carry *ADRB2* 16arg and 27gln variants, which have been associated with a decreased risk of metabolic syndrome (Dallongeville et al, 2003; Gjesing et al, 2007). The 825t allele of the G-protein beta3-subunit gene (*GNB3*) has been shown to be associated with metabolic syndrome and hypertension (Weinstein et al, 2006). We found that Thp1, U937, HL60, Kyn2 and Caco2 cell lines carry at least one mutated allele at this locus. *ADD1* and *SCNNIA* genes are involved in sodium reabsorption. *ADD1* 460trp and *SCNNIA* 663thr polymorphisms were reported to be associated with hypertension susceptibility (Vormfelde et al, 2007). In this investigation, we found that HL60, HepG2 and Caco2 cells were homozygous for *ADD1* GLY460 polymorphism while Thp1 cell line is homozygous for *SCNNIA* ALA663. Regarding genes that are involved in arachidonic acid metabolism, Thp1, HL60 and HepG2 cell lines genotyping showed that these cells are heterozygous for A-444c of the *LTC4S* gene. On the other hand, the natriuretic peptide precursor A (*NPPA*) gene encodes for the precursor of the atrial natriuretic polypeptide. In this study, Thp1 cell line is homozygous for the mutated allele 7met of *NPPA*. Meanwhile, U937 cells were heterozygous for C231t of the inducible nitric oxid synthase gene (*NOS2A*). HL60 and K562 cells carry mutations -948g and 298asp of *NOS3*. Finally, HepG2 cells were heterozygous for -948g and 298asp of *NOS3* and also for T2238c of *NPPA*.

Genetic profile of genes associated with coagulation and other processes

Polymorphisms of coagulation factor genes were also investigated in our cell lines (**Supplementary Table 6**). These cell lines were homozygous for G20210 in *FII* gene, ARG506 in *FV* gene and del-323 and ARG353 in *FVII* gene. HepG2 is the only cell line found to carry mutated allele at position -455 of *FGB*, which seems to be associated with increased plasma fibrinogen (van 't Hooft et al, 1999). Thp1, U937 and HepG2 cell lines were mutated for G873a of *GPIA* and K562 and Caco2 cells were heterozygous for *GPIIIA* LEU33pro. For *PAII* gene, there is at least one mutated variant at position 675 for both K562 and Caco2 cells and at position 11053 for all cell lines. Polymorphisms in *MTHFR* and *CBS* genes have been associated with hyperhomocysteinemia, a risk factor for vascular disease

(Jakubowski, 2006). While Thp1, HL60, HepG2 and Kyn2 cells showed at least one mutated allele at position 677 of *MTHFR* gene, K562 seems to be the only cell line that carries mutated allele at position 278 in *CBS* gene. Genes associated with oxidative stress were also genotyped. U937 and HL60 cells were homozygous for the wild type alleles of the paroxonases *PON1* and *PON2*, while Thp1, Kyn2 and Caco2 cells carry mutated alleles of *PON1* and wild-type allele of *PON2*. K562 and HepG2 cell lines carry mutations for both genes. In terms of transcription factors, the seven cell lines investigated here were homozygous for the wild-type allele of *PPARG* PRO12ala and *TCF7* PRO19thr polymorphisms. However, Thp1, HepG2, Kyn2 and HL60 cells have at least one allele mutated for the MET1thr polymorphism of *VDR* which is associated with susceptibility to diabetes (Marti et al, 2004; Zemunik et al, 2005; Capoluongo et al, 2006). Finally, *GC* haplotype including the 416glu variant, which is also associated with susceptibility to type I diabetes (Ongagna et al, 2005), was found in Thp1, HL60, K562, HepG2 and Caco2 cell lines.

DISCUSSION

It is well known that genetic alterations contribute to the development of a number of diseases including cardiovascular pathology. Because different cell lines are commonly used to model this disease, establishing a genetic profile of these cells with respect to candidate genes known to be involved in cardiovascular disease is of great scientific interest and fundamental if we are to use these cells effectively in understanding underlined mechanism(s). Knowledge of these genetic profiles may present many advantages. 1) It may help scientists choosing the right in vitro model for their investigations since genetic variation may be responsible for discrepancy in the results when comparing in vivo and in vitro models. 2) It may also ease studying the impact of one or several polymorphisms of gene(s) on the development of a disease. With this in mind, we thought it may be of interest to screen certain cell lines for a number of polymorphisms within genes associated with cardiovascular pathophysiology. In the present study, numerous polymorphisms within genes known to be involved in the initiation and the development of cardiovascular pathologies or in the drug treatment response were indeed found in studied cell lines including Thp1, U937, HL60, K562, Kyn2, HepG2 and Caco2. Due to the high number of polymorphisms studied here, we will not discuss all of them but we will focus on lipid metabolism and transporters genes and their genotypes in cell lines of interest.

Gene variants are known to influence lipid homeostasis (Knoblauch et al, 2004; Klos et al, 2006) and response to hypolipemic treatment (Chasman et al, 2004; Thompson et al, 2005; Schmitz and Langmann, 2006). In addition, continuous cell lines are often used to study cardiovascular pathophysiology. For instance, monocytic cells Thp1 and U937, which can be differentiated into macrophages or foam cells, were proved to be interesting models to study molecular mechanisms of atherosclerosis (Fach et al, 2004; Namgaladze and Brune, 2006; Riou et al, 2007). While investigating genetic profile of these cells, we found that these two cell lines present many mutated alleles in several genes linked to lipid and lipoprotein metabolism. This genotype should be thus taken in consideration when using an in vitro model to study lipid homeostasis.

ApoE genotype is among the most-widely-studied polymorphisms in relation to cardiovascular diseases risk. Meta-analyses suggest that apoE4 carriers may have 40-50% increased risk of cardiovascular diseases. Different cell lines have been used to understand the role of this variant. Here, we found U937 to be the only cell line that carried ϵ 4 allele of *APOE* gene. This

polymorphism seems also to be associated with susceptibility to Alzheimer disease and with lower response to statins (Maitland-van der Zee et al, 2003). Therefore, identification of such a model with apoE4 genotype may be necessary for biochemical characterization of the impact of this polymorphism on different aspects of either atherosclerosis or Alzheimer disease.

Cell lines are also used to study cardiovascular drug pharmacokinetics and pharmacodynamics. Genetic variations of membrane transporters like the ABC-transporter ABCB1 may substantially impact the pharmacokinetic properties of endogenous substrates and drugs such as statins. *ABCB1* gene is polymorphic. Previous studies have reported that C1236t, G2677t/a and C3435t mutations within this gene are associated with in vivo modulation of statin treatment (Marzolini et al, 2004). For example, 1236t is associated with a higher response to simvastatin and therefore with a higher decrease in total cholesterol and in LDL cholesterol (Fiegenbaum et al, 2005). Hence, optimum doses of ABCB1 substrates may vary between patients with different genetic profiles and dose adjustment may be required to maintain effectiveness and to avoid toxicity of these substrates. Here we present the first evidence that indeed, Thp1 and U937 are homozygous for the three variants of *ABCB1* gene while HepG2 and Caco2 cell lines are respectively wild-type and heterozygous for these three polymorphisms. Thus, one should consider these types of genetic variations when utilizing these cells for statins pharmacokinetic or pharmacodynamic modeling. Knowledge of such genetic profiles of different cells might also help to clarify the potential impact of a given polymorphism on lipid metabolism. For example, it is not clear yet whether the *ABCA1* gene mutation at position -564 is associated with a favorable or unfavorable lipid profile (Kokubo et al, 2006; Benton et al, 2007). While Kyn2 cell line is homozygous for the wild-type allele, the other hepatic cell line, HepG2, is homozygous mutated for *ABCA1* C-564t. Other transporters are also of interest in lipid transport including ABCA1 and ABCG8 which are responsible for inverse cholesterol transport from peripheral cells to the liver and for limitation of intestinal absorption of sterols respectively (OMIM Database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>). Both transporters are potent hypolipemic drug targets (Oram and Heinecke, 2005). In this study, we found that HepG2 is the only cell line that carries *ABCA1* 219lys mutant which has been shown to be associated with lower susceptibility to coronary complications (Benton et al, 2007). On the other hand, the *ABCG8* variant allele at position THR400lys was associated with lower response to hypolipemic dietetic treatment (Hubacek et al, 2004). Here, we found that the intestinal cell line Caco2 is homozygous mutated for this polymorphism while other cells are wild-type carriers. Overall, genetic profiles

of continuous cell lines should be considered when used as an in vitro model to study lipid and drug transporters.

Cellular models are widely used to study gene expression profiling. For example, it was shown that Kyn2 and HepG2 cells express active PPAR gamma (Rumi et al, 2001) and ApoE (Brahimi et al, 2001). Studies have been interested into cell line genetic profiles in order to correlate them with expression of diverse phenotypes. For example, Sun and colleagues (Sun et al, 2005) have studied mutations and expression of telomeric repeat binding factor (TRF1) in malignant hematopoietic cell lines, including K562, HL60, U937 and Thp1, to clarify if *hTRF1* mutation is one of the factors of the activation of telomerase in malignant hematopoietic disease. To our knowledge, there is no study in the literature that has taken genetic profiling approach of many cell lines except that of Brandon and collaborators (Brandon et al, 2006). The latest study has described the profile of IGROV1, LS180, HepG2 and Caco2 cell lines with respect to 34 polymorphisms within 11 CYP450, 37 polymorphisms within genes involved in drug metabolism (phase II enzymes) and 17 polymorphisms within three ABC transporter genes in order to validate these models frequently used in drug metabolism and transport studies. To note, these enzymes and transporters also have physiologic substrates important in the cardiovascular domain such as leukotrienes and lipids.

In our study, we have genotyped HepG2 and Caco2 cells for polymorphisms within *ABCB1* gene. Our data are in agreement with those reported by Brandon et al. (Brandon et al, 2006) regarding the genotype of HepG2 cells with respect to polymorphisms in *ABCB1* gene. However, they are in disagreement with genotype of Caco2 cells. While Brandon et al. have observed that Caco2 cells are mutated for C3435t and wild-type homozygous for C1236t and G2677t/a, we found that these cells are heterozygous at the three loci. These differences could be attributed to the use of a different Caco2 clone or to a different passage number. Indeed, in continuous cell lines, genotype alteration might occur at a high number of passages (Wenger et al, 2004). In this sense, Hughes et al. have suggested that distorted data seen in a number of studies would result of over-passaged, misidentified or contaminated cell lines (Hughes et al, 2007). Therefore, extrapolation of in vitro results to humans is not that easy and one should be extremely cautious. In vitro model is not an absolute substitute for in vivo model, but it represents a complementary approach that allows biochemical characterization of a given process. Continuous cell lines also have other advantages including homogeneity of the cell population, differentiation capacity, survival and

reproducibility of the experiments, reasons why there are largely used by the scientific community.

In this study, we focused on hematopoietic, hepatic and intestinal cell lines. Other tissues are of interest but, to date; we don't have commonly used continuous cell line for all the cell types. For example, in terms of human endothelial cells, it is preferably to use primary cultures with limited lifetime. Continuous cell lines with a limited population doubling levels are available but not so frequently used. In addition, since cell lines are derived from a specific tissue, either mononuclear cells, hepatic or intestinal tissue, they do not express all of the existing genes (supplementary table 1). Moreover, one should keep in mind that continuous cells don't always express the same panel of genes as the original tissue (Lenaerts et al, 2007). Finally, we should be aware that Thp1, U937, HL60, K562, Kyn2, HepG2 and Caco2 cell lines were derived from cells of patients with cancer. Therefore, these continuous cell lines may present defect in DNA repair or chromosomal translocations that could affect expression of the studied genes. They retain genetic abnormalities that were present in the original cancerous tissue such as loss and rearrangement involving chromosomes 5, 7 and 16 in HL60 cells (Liang et al, 1999).

In conclusion, our study demonstrates that commonly used cell lines carry numerous polymorphisms within genes including those involved in the initiation and the development of cardiovascular pathologies or in drug treatment response. Therefore, although these cell lines represent an attractive and convenient in vitro model to study cardiovascular pathophysiology and pharmacotoxicology, their genetic profiles must be taken carefully in consideration when interpreting results generated from these cells. Finally, our data bank of cell lines genetic profile may bring insight into the design and choice of an in vitro model and may help to explain conflicting data generated from in vivo and in vitro models.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Garnotel, Pr Jeannesson, Pr Dauca and Dr Sabolovic for kindly providing cell lines. We also thank Roche Molecular Systems (Alameda, CA, USA) for providing us material to perform multiplex genotyping analyses.

REFERENCES

- Argmann CA, Edwards JY, Sawyez CG, O'Neil CH, Hegele RA, Pickering JG and Huff MW. Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition: a role for RhoA in ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 2005; 280 (23): 22212-21.
- Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, Schaefer EJ, Cupples AL, Lipton R, Cheng S and Shuldiner AR. Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. *Jama.* 2003; 290 (15): 2030-40.
- Baudin B. Angiotensin II receptor polymorphisms in hypertension. *Pharmacogenomic considerations. Pharmacogenomics.* 2002; 3 (1): 65-73.
- Benton JL, Ding J, Tsai MY, Shea S, Rotter JJ, Burke GL and Post W. Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis.* 2007; 193 (2): 352-60.
- Brahimi F, Bertrand P, Starck M, Galteau MM and Siest G. Control of apolipoprotein E secretion in the human hepatoma cell line KYN-2. *Cell Biochem Funct.* 2001; 19 (1): 51-8.
- Brandon EF, Bosch TM, Deenen MJ, Levink R, van der Wal E, van Meerveld JB, Bijl M, Beijnen JH, Schellens JH and Meijerman I. Validation of in vitro cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 211 (1): 1-10.
- Capoluongo E, Pitocco D, Concolino P, Santonocito C, Di Stasio E, d'Onofrio G, Manto A, Giardina B, Ghirlanda G, Ameglio F and Zuppi C. Slight association between type 1

- diabetes and "ff" VDR FokI genotype in patients from the Italian Lazio Region. Lack of association with diabetes complications. *Clin Biochem.* 2006; 39 (9): 888-92.
- Chasman DI, Posada D, Subrahmanyam L, Cook NR, Stanton VP, Jr. and Ridker PM. Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *Jama.* 2004; 291 (23): 2821-7.
- Cheng S, Grow MA, Pallaud C, Klitz W, Erlich HA, Visvikis S, Chen JJ, Pullinger CR, Malloy MJ, Siest G and Kane JP. A multilocus genotyping assay for candidate markers of cardiovascular disease risk. *Genome Res.* 1999; 9 (10): 936-49.
- Cheng S, Pallaud C, Grow MA, Scharf SJ, Erlich HA, Klitz W, Pullinger CR, Malloy MJ, Kane JP, Siest G and Visvikis S. A multilocus genotyping assay for cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med.* 1998; 36 (8): 561-6.
- Dallongeville J, Helbecque N, Cottel D, Amouyel P and Meirhaeghe A. The Gly16-->Arg16 and Gln27-->Glu27 polymorphisms of beta2-adrenergic receptor are associated with metabolic syndrome in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88 (10): 4862-6.
- Fach EM, Garulacan LA, Gao J, Xiao Q, Storm SM, Dubaquié YP, Hefta SA and Opiteck GJ. In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2004; 3 (12): 1200-10.
- Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC and Hutz MH. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 78 (5): 551-8.
- Flex A, Gaetani E, Papaleo P, Straface G, Proia AS, Pecorini G, Tondi P, Pola P and Pola R. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. *Stroke.* 2004; 35 (10): 2270-5.
- Garrigues A, Escargueil AE and Orłowski S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99 (16): 10347-52.
- Gjesing AP, Andersen G, Burgdorf KS, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Hansen T and Pedersen O. Studies of the associations between functional beta2-adrenergic receptor variants and obesity, hypertension and type 2 diabetes in 7,808 white subjects. *Diabetologia.* 2007; 50 (3): 563-8.
- Hamid YH, Rose CS, Urhammer SA, Glumer C, Nolsoe R, Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Hansen T and Pedersen O. Variations of the interleukin-6

- promoter are associated with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia*. 2005; 48 (2): 251-60.
- Hoppe C, Cheng S, Grow M, Silbergleit A, Klitz W, Trachtenberg E, Erlich H, Vichinsky E and Styles L. A novel multilocus genotyping assay to identify genetic predictors of stroke in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2001; 114 (3): 718-20.
- Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L, Girard T, Vichinsky E and Styles L. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2004; 103 (6): 2391-6.
- Hubacek JA, Berge KE, Stefkova J, Pitha J, Skodova Z, Lanska V and Poledne R. Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels. *Physiol Res*. 2004; 53 (4): 395-401.
- Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H and Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques*. 2007; 43 (5): 575, 577-8, 581-2 passim.
- Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E and Miller GJ. The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J*. 2001; 22 (24): 2243-52.
- Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Ayaori M, Tanaka N, Kusuhara M, Ohsuzu F and Yokoyama S. ATP-binding cassette transporter A1 gene transcription is downregulated by activator protein 2alpha. Doxazosin inhibits activator protein 2alpha and increases high-density lipoprotein biogenesis independent of alpha1-adrenoceptor blockade. *Circ Res*. 2007; 101 (2): 156-65.
- Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr*. 2006; 136 (6 Suppl): 1741S-1749S.
- Jeannesson E, Albertini L, Siest G, Gomes AM, Ribeiro V, Aslanidis C, Schmitz G and Visvikis-Siest S. Determination of ABCB1 polymorphisms and haplotypes frequencies in a French population. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007; 21 (4): 411-8.
- Jensen MK, Pai JK, Mukamal KJ, Overvad K and Rimm EB. Common genetic variation in the ATP-binding cassette transporter A1, plasma lipids, and risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2007; 195 (1): e172-80.
- Klos KL, Sing CF, Boerwinkle E, Hamon SC, Rea TJ, Clark A, Fornage M and Hixson JE. Consistent effects of genes involved in reverse cholesterol transport on plasma lipid and apolipoprotein levels in CARDIA participants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26 (8): 1828-36.

- Knoblauch H, Bauerfeind A, Toliat MR, Becker C, Luganskaja T, Gunther UP, Rohde K, Schuster H, Junghans C, Luft FC, Nurnberg P and Reich JG. Haplotypes and SNPs in 13 lipid-relevant genes explain most of the genetic variance in high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol. *Hum Mol Genet.* 2004; 13 (10): 993-1004.
- Kokubo Y, Tomoike H, Tanaka C, Banno M, Okuda T, Inamoto N, Kamide K, Kawano Y and Miyata T. Association of sixty-one non-synonymous polymorphisms in forty-one hypertension candidate genes with blood pressure variation and hypertension. *Hypertens Res.* 2006; 29 (8): 611-9.
- Lai CQ, Parnell LD and Ordovas JM. The APOA1/C3/A4/A5 gene cluster, lipid metabolism and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol.* 2005; 16 (2): 153-66.
- Lenaerts K, Bouwman FG, Lamers WH, Renes J and Mariman EC. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics.* 2007; 8: 91.
- Liang JC, Ning Y, Wang RY, Padilla-Nash HM, Schrock E, Soenksen D, Nagarajan L and Ried T. Spectral karyotypic study of the HL-60 cell line: detection of complex rearrangements involving chromosomes 5, 7, and 16 and delineation of critical region of deletion on 5q31.1. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999; 113 (2): 105-9.
- Maejima T, Yamazaki H, Aoki T, Tamaki T, Sato F, Kitahara M and Saito Y. Effect of pitavastatin on apolipoprotein A-I production in HepG2 cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 324 (2): 835-9.
- Maitland-van der Zee AH, Stricker BH, Klungel OH, Mantel-Teeuwisse AK, Kastelein JJ, Hofman A, Leufkens HG, van Duijn CM and de Boer A. Adherence to and dosing of beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in the general population differs according to apolipoprotein E-genotypes. *Pharmacogenetics.* 2003; 13 (4): 219-23.
- Marti G, Audi L, Esteban C, Oyarzabal M, Chueca M, Gussinye M, Yeste D, Fernandez-Cancio M, Andaluz P and Carrascosa A. [Association of vitamin D receptor gene polymorphism with type 1 diabetes mellitus in two Spanish populations]. *Med Clin (Barc).* 2004; 123 (8): 286-90.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T and Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 75 (1): 13-33.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16 (3): 1215.

- Nagai F, Hiyoshi Y, Sugimachi K and Tamura HO. Cytochrome P450 (CYP) expression in human myeloblastic and lymphoid cell lines. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25 (3): 383-5.
- Namgaladze D and Brune B. Phospholipase A2-modified low-density lipoprotein activates the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway and increases cell survival in monocytic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26 (11): 2510-6.
- Ongagna JC, Pinget M and Belcourt A. Vitamin D-binding protein gene polymorphism association with IA-2 autoantibodies in type 1 diabetes. *Clin Biochem.* 2005; 38 (5): 415-9.
- Oram JF and Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev.* 2005; 85 (4): 1343-72.
- Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y and Tanaka T. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet.* 2002; 32 (4): 650-4.
- Pai JK, Kraft P, Cannuscio CC, Manson JE, Rexrode KM, Albert CM, Hunter D and Rimm EB. Polymorphisms in the CC-chemokine receptor-2 (CCR2) and -5 (CCR5) genes and risk of coronary heart disease among US women. *Atherosclerosis.* 2006; 186 (1): 132-9.
- Pallaud C, Gueguen R, Sass C, Grow M, Cheng S, Siest G and Visvikis S. Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas Cohort. *J Lipid Res.* 2001; 42 (11): 1879-90.
- Riou S, Mees B, Esposito B, Merval R, Vilar J, Stengel D, Ninio E, van Haperen R, de Crom R, Tedgui A and Lehoux S. High pressure promotes monocyte adhesion to the vascular wall. *Circ Res.* 2007; 100 (8): 1226-33.
- Rumi MA, Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Hamamoto S, Kazumori H, Okuyama T, Fukuda R, Nagasue N and Kinoshita Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2001; 84 (12): 1640-7.
- Schmitz G and Langmann T. Pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. *Vascul Pharmacol.* 2006; 44 (2): 75-89.
- Shiau MY, Wu CY, Huang CN, Hu SW, Lin SJ and Chang YH. TNF-alpha polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in Taiwanese patients. *Tissue Antigens.* 2003; 61 (5): 393-7.
- Sie MP, Uitterlinden AG, Bos MJ, Arp PP, Breteler MM, Koudstaal PJ, Pols HA, Hofman A, van Duijn CM and Witteman JC. TGF-beta 1 polymorphisms and risk of myocardial infarction and stroke: the Rotterdam Study. *Stroke.* 2006; 37 (11): 2667-71.

- Sun J, Huang H, Zhu YY, Lan JP, Li JY, Lai XY and Yu J. Study on the expression and mutation of human telomeric repeat binding factor (hTRF1) in 10 malignant hematopoietic cell lines. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005; 6 (12): 1141-7.
- Thompson JF, Lira ME, Durham LK, Clark RW, Bamberger MJ and Milos PM. Polymorphisms in the CETP gene and association with CETP mass and HDL levels. *Atherosclerosis*. 2003; 167 (2): 195-204.
- Thompson JF, Man M, Johnson KJ, Wood LS, Lira ME, Lloyd DB, Banerjee P, Milos PM, Myrand SP, Paulauskis J, Milad MA and Sasiela WJ. An association study of 43 SNPs in 16 candidate genes with atorvastatin response. *Pharmacogenomics J*. 2005; 5 (6): 352-8.
- Trompet S, Pons D, AJ DEC, Slagboom P, Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, Cobbe SM, Bollen EL, Buckley BM, Ford I, Hyland M, Gaw A, Macfarlane PW, Packard CJ, Norrie J, Perry IJ, Stott DJ, Sweeney BJ, Twomey C, Westendorp RG and Jukema JW. Genetic variation in the interleukin-10 gene promoter and risk of coronary and cerebrovascular events: the PROSPER study. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1100: 189-98.
- van 't Hooft FM, von Bahr SJ, Silveira A, Iliadou A, Eriksson P and Hamsten A. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19 (12): 3063-70.
- Verstuyft C, Strabach S, El-Morabet H, Kerb R, Brinkmann U, Dubert L, Jaillon P, Funck-Brentano C, Trugnan G and Becquemont L. Dipyridamole enhances digoxin bioavailability via P-glycoprotein inhibition. *Clin Pharmacol Ther*. 2003; 73 (1): 51-60.
- Vormfelde SV, Sehart D, Toliat MR, Schirmer M, Meineke I, Tzvetkov M, Nurnberg P and Brockmoller J. Genetic variation in the renal sodium transporters NKCC2, NCC, and ENaC in relation to the effects of loop diuretic drugs. *Clin Pharmacol Ther*. 2007; 82 (3): 300-9.
- Weinstein LS, Chen M, Xie T and Liu J. Genetic diseases associated with heterotrimeric G proteins. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27 (5): 260-6.
- Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N and Grant SG. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep*. 2004; 24 (6): 631-9.
- Xu CF, Talmud P, Schuster H, Houlston R, Miller G and Humphries S. Association between genetic variation at the APO AI-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidaemia. *Clin Genet*. 1994; 46 (6): 385-97.

- Yu YL, Huang ZY, Yang PY and Rui YC. Proteomic studies of macrophage-derived foam cell from human U937 cell line using two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 42 (6): 782-9.
- Zee RY, Cook NR, Cheng S, Reynolds R, Erlich HA, Lindpaintner K and Ridker PM. Polymorphism in the P-selectin and interleukin-4 genes as determinants of stroke: a population-based, prospective genetic analysis. *Hum Mol Genet.* 2004; 13 (4): 389-96.
- Zemunik T, Skrabic V, Boraska V, Diklic D, Terzic IM, Capkun V, Peruzovic M and Terzic J. FokI polymorphism, vitamin D receptor, and interleukin-1 receptor haplotypes are associated with type 1 diabetes in the Dalmatian population. *J Mol Diagn.* 2005; 7 (5): 600-4.
- OMIM Database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>.

Table 1: Selected genes potentially involved in different pathways of cardiovascular diseases.

Biological processes associated with cardiovascular diseases	Candidates genes
Inflammation	<i>CCR2, CCR3, CCR5, CSF2, IL10, IL13, IL1A, IL1B, IL4, IL4R, IL5RA, IL6, IL9, LTA, SCYA11, CXCL12 (=SDF1), TNFA, SCGB1A1 (=UGB)</i>
Cellular adhesion	<i>ICAM1, MMP3, SELE, SELP, VCAM1</i>
Growth factors	<i>TGFB1</i>
Immune system	<i>C3, C5, CD14, CTLA4, MS4A2(=FCERB1)</i>
Lipids and lipoproteins metabolism	<i>ABCA1, ABCB1, ABCG8, APOA4, APOB, APOC3, APOE, CETP, LDLR, LIPC, LPA, LPL</i>
Blood pressure	<i>ACE, AGT, AGTR1, ADRB2, ADRB3, GNB3, ADD1, SCNN1A (=ENaCa), LTC4S, NPPA, NOS2A, NOS3</i>
Thrombosis	<i>FII, FV, FVII, FGB, ITGA2 (=GPIA), ITGB3 (=GPIIIA), PAI</i>
Homocysteine metabolism	<i>CBS, MTHFR</i>
Oxidative stress	<i>PON1, PON2</i>
Transcription factors	<i>PPARG, TCF7, VDR</i>
Others	<i>GC (=VDBP)</i>

Jeannesson et al. - Supplementary tables 1-6

Supplementary table 1: Genes selected related to different cardiovascular processes

Symbol	OMIM	Gene Map Locus	Subcellular location (UniProt Knowledgebase except if indicated)	Roles and Disorders (OMIM except if indicated)
INFLAMMATION				
<i>CCR2</i>	601267	3p21	Produced by endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages	Receptor for MCP1, MCP3 and MCP4. May be involved in inflammatory processes in rheumatoid arthritis, alveolitis, and tumor infiltration. May also be an important component of monocyte invasion of artery walls in atherosclerosis (Quinones et al, 2007)
<i>CCR3</i>	601268	3p21.3	Eosinophils. Trace amounts in neutrophils and monocytes	Binds to eotaxin, eotaxin 3, MCP3, MCP4, RANTES and MIP1 delta. Complex role in allergic disease
<i>CCR5</i>	601373	3p21	Predominantly expressed on T cells, macrophages, dendritic cells and microglia	Binds to MIP1 α , MIP1 β and RANTES. May play a role in inflammatory responses to infection and in the initiation of atherosclerotic plaques (Quinones et al, 2007)
<i>CSF2</i>	138960	5q31.1	Secreted by macrophages, T cells, mast cells, endothelial cells and fibroblasts	Cytokine. Stimulates the growth and differentiation of hematopoietic precursor cells from various lineages, including granulocytes, macrophages, eosinophils and erythrocytes. Susceptibility to atopic asthma
<i>IL10</i>	124092	1q31-q32	Produced by a variety of cell lines, including T-cells, macrophages and mast cells	Inhibits the synthesis of a number of cytokines. Antiinflammatory effects. May arrest and reverse the chronic inflammatory response in established atherosclerosis. IL10 levels are associated with the metabolic syndrome
<i>IL13</i>	147683	5q31	Expressed in activated human T lymphocytes	Inhibits inflammatory cytokine production. May be critical in regulating inflammatory and immune responses. Asthma susceptibility
<i>IL1A</i>	147760	2q14	Synthesized by a variety of cell types including activated macrophages, keratinocytes, stimulated B lymphocytes, and fibroblasts	Potent mediator of inflammation and immunity
<i>IL1B</i>	147720	2q14	Synthesized by a variety of cell types including activated macrophages, keratinocytes, stimulated B lymphocytes, and fibroblasts	Potent mediators of inflammation and immunity
<i>IL4</i>	147780	5q31.1	Th2 cells	Key regulator in humoral and adaptive immunity. Many biological roles
<i>IL4R</i>	147781	16p12.1-p11.2	Activated T-cells (2 isoforms)	Receptor for both IL4 and IL13. Involved in promoting Th2 differentiation, regulating IgE production and chemokine and mucus production at sites of allergic inflammation. Susceptibility to atopy
<i>IL5RA</i>	147851	3p26-p24	Expressed on eosinophils and basophils	Receptor for IL5
<i>IL6</i>	147620	7p21	T cells and macrophages, muscles, osteoblasts	Pro-inflammatory cytokine with a wide variety of biological functions. One of the most important mediators of fever and of the acute phase response. Osteopenia/osteoporosis; susceptibility to Kaposi sarcoma
<i>IL9</i>	146931	5q31.1	Produced by CD4+ helper cells	May serve as a regulator of both lymphoid and myeloid systems
<i>LTA</i>	153440	6p21.3	Secreted by activated lymphocytes	Presumed to act as a modulator in the immune response. Associated with susceptibility to myocardial infarction
<i>SCYA11</i>	601156	17q21.1-q21.2	Expressed in pancreas (http://hdbase.org)	Binds to CCR3. Promotes the accumulation of eosinophils. May contribute to angiogenesis in conditions accompanied by eosinophil infiltration such as Hodgkin lymphoma, endometriosis, and allergic diathesis

Symbol	OMIM	Gene Map Locus	Subcellular location (UniProt Knowledgebase except if indicated)	Roles and Disorders (OMIM except if indicated)
<i>CXCL12</i>	600835	10q11.1	Highest expression were detected in liver, pancreas and spleen (Yu et al, 2006)	Chemoattractant active on T-lymphocytes and monocytes. May have a role in immune surveillance and in basal extravasation of lymphocytes and monocytes rather than in inflammation. Highly expressed in atherosclerotic plaques (Coll et al, 2005)
<i>TNFA</i>	191160	6p21.3	Secreted predominantly by monocytes/macrophages	Multifunctional proinflammatory cytokine that has effects on lipid metabolism, coagulation, insulin resistance, and endothelial function. Susceptibility to cerebral malaria, septic shock, asthma, vascular dementia, migraine
<i>SCGB1A1</i>	192020	11q12.3-q13.1	Expressed by most cells of epithelial origin	Putative role: immunoregulatory and anti-inflammatory in innate immunity (Shijubo et al, 2003). Asthma susceptibility
CELLULAR ADHESION				
<i>ICAM1</i>	147840	19p13.3-p13.2	Expressed by the vascular endothelium, macrophages and lymphocytes	Ligand for lymphocyte function-associated antigens. Susceptibility to cerebral malaria
<i>MMP3</i>	185250	11q23	Produced predominantly by connective tissue cells	Involved in connective tissue remodeling during atherogenesis. Susceptibility to coronary heart disease
<i>SELE</i>	131210	1q23-q25	Expressed only on endothelial cells activated by cytokines	Recruitment of blood leukocytes at sites of inflammation by mediating the adhesion of cells to the vascular lining. Marker for the atherosclerotic plaque in the vasculature. Blood pressure regulation
<i>SELP</i>	173610	1q23-q25	Endothelial cells and activated platelets	Essential role in the initial recruitment of leukocytes to the site of injury during inflammation. Expression was found to be significantly and positively correlated with carotid artery stiffness and wall thickness. Expression is increased in atherosclerotic plaques, and high plasma levels of this molecule are found in patients with unstable angina
<i>VCAM1</i>	192225	1p32-p31	Expressed only on endothelial cells activated by cytokines	Cell surface glycoprotein. Promotes the adhesion of lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils. Increased serum levels of soluble VCAM1 predicted recurrent ischemic stroke
GROWTH FACTOR				
<i>TGFB1</i>	190180	19q13.1	Highly expressed in bone	Control proliferation, differentiation, and other functions in many cell types. It regulates the actions of many other growth factors and determines a positive or negative direction of their effects. It plays an important role in bone remodelling. Hyper expression might be a risk factor for HT and hypertensive complications
IMMUNE SYSTEM				
<i>C3</i>	120700	19p13.3-p13.2	Liver is the main site of synthesis. Small amounts also produced by activated monocytes	Acute phase reactant. Increased synthesis of C3 is induced during acute inflammation. C3 deficiency
<i>C5</i>	120900	9q34.1	Liver, tonsils, brain and bone marrow (GENATLAS database http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/)	It is cleaved into C5a and C5b: C5a plays an important role in chemotaxis & C5b forms the first part of the complement membrane attack complex. Deficiency of C5 might lead to an anti-inflammatory phenotype. Susceptibility to liver fibrosis
<i>CD14</i>	158120	5q31.1	Expressed on the surface of monocytes and of granulocytes and by most tissue macrophages	Important receptor of innate immunity, leading to NFkB activation, cytokine secretion and the inflammatory response. Up-regulates cell surface molecules, including adhesion molecules
<i>CTLA4</i>	123890	2q33	Widely expressed with highest levels in lymphoid tissues	Possibly involved in T-cell activation. Susceptibility to diseases including diabetes mellitus insulin-dependent
<i>MS4A2</i>	147138	11q13	Expressed on mast cells and basophils	The high affinity IgE receptor is responsible for initiating the allergic response. Susceptibility to atopy

Symbol	OMIM	Gene Map Locus	Subcellular location (UniProt Knowledgebase except if indicated)	Roles and Disorders (OMIM except if indicated)
LIPIDS METABOLISM				
<i>ABCA1</i>	600046	9q22-q31	Widely expressed, but most abundant in macrophages	Cholesterol efflux pump in the cellular lipid removal pathway. Tangier disease, familial HDL deficiency, coronary artery disease in familial hypercholesterolemia
<i>ABCB1</i>	171050	7q21.1	Expressed mainly in liver, kidney, intestine & brain	Efflux a variety of drugs from the cells back into the blood. Drug resistance. Role in cholesterol homeostasis?
<i>ABCG8</i>	605460	2p21	Expressed at a high level in the liver and at lower levels in the small intestine and colon	Limits intestinal absorption and promotes biliary excretion of sterols. Mutated forms of this transporter predispose to sterol accumulation and atherosclerosis (Berge et al, 2000)
<i>APOA4</i>	107690	11q23	Synthesized in the intestine and secreted in plasma	Component of chylomicrons and HDL. Required for efficient activation of lipoprotein lipase by ApoC; potent activator of LCAT. Disorder of lipid metabolism
<i>APOB</i>	107730	2p24	Occurs in the plasma in 2 main forms, apoB48 (gut) and apoB100 (liver)	Major protein constituent of chylomicrons (apo B48), LDL (apo B100) and VLDL (apo B100). Apo B100 functions as a recognition signal for the cellular binding and internalization of LDL particles by the apoB/E receptor. Disorder of lipid metabolism
<i>APOC3</i>	107720	11q23	Synthesized predominantly in liver and to a lesser degree in intestine	Constitutes 50% of the protein fraction of VLDL and 2% of that of HDL. Inhibits lipoprotein lipase and hepatic lipase and decreases the uptake of lymph chylomicrons by hepatic cells. This suggests that it delays the catabolism of triglyceride-rich particles. Disorder of lipid metabolism and disturbance of glucose homeostasis
<i>APOE</i>	107741	19q13.2	Significant quantities are produced in liver, brain, spleen, lung, adrenal, ovary, kidney and muscle. Secreted protein	Occurs in all lipoprotein fractions in plasma. Essential for the normal catabolism of triglyceride-rich lipoprotein constituents. Major isoforms of human apolipoprotein E (apoE2, -E3, and -E4) are coded for by 3 alleles (epsilon 2, 3, and 4). Disorder of lipid metabolism. Familial dysbetalipoproteinemia, characterized by elevated plasma cholesterol and triglyceride levels and an increased risk for atherosclerosis. Susceptibility to CAD
<i>CETP</i>	118470	16q21	Expressed by the liver and secreted in plasma	Involved in the transfer of insoluble cholesteryl esters in the reverse transport of cholesterol from HDL to other lipoproteins. A defect is associated with increased HDLc levels. Association with CVD
<i>LDLR</i>	606945	19p13.2	Widely expressed	Cell surface receptor that binds LDL and transports it into cells by endocytosis. The receptor defect (familial hypercholesterolemia) impairs the catabolism of LDL, and the resultant elevation in plasma LDLc promotes deposition of cholesterol in the skin (xanthelasma), tendons (xanthomas), and coronary arteries (atherosclerosis)
<i>LIPC</i>	151670	15q21-q23	?	Catalyzes hydrolysis of phospholipids, mono-, di-, and triglycerides, and acyl-CoA thioesters. Important enzyme in HDL metabolism. Hepatic lipase deficiency associated to some genetic variants
<i>LPA</i>	152200	6q27	Assembled in the blood from LDL molecules and glycoprotein molecules called apolipoprotein-a	High plasma lipoprotein (a) concentrations are an independent risk factor for atherosclerotic diseases. Hyperlipoproteinemia. Striking similarities to human plasminogen
<i>LPL</i>	609708	8p22	Endothelial cells, liver, macrophages & adipocytes	Hydrolysis of TG of circulating chylomicrons and VLDL. Deficiency in LPL leads to hypertriglyceridemia and to familial hyperlipoproteinemia type I (hyperchylomicronemia)

Symbol	OMIM	Gene Map Locus	Subcellular location (UniProt Knowledgebase except if indicated)	Roles and Disorders (OMIM except if indicated)
BLOOD PRESSURE				
Renin-Angiotensin System				
<i>ACE</i>	106180	17q23	Ubiquitously expressed. Highest levels in lung, kidney, heart, gastrointestinal system and prostate	Blood pressure, electrolyte balance and neurohormonal regulation. Candidate gene in hypertension (HT)
<i>AGT</i>	106150	1q42-q43	Expressed by the liver and secreted in plasma	Angiotensin precursor. Blood pressure, electrolyte balance and neurohormonal regulation. Candidate gene in HT
<i>AGTIR</i>	106165	3q21-q25	Predominate in many tissues	Mediate the major cardiovascular effects of angiotensin II. Blood pressure, electrolyte balance and neurohormonal regulation. Candidate gene in HT
Adrenergic-cholinergic receptors				
<i>ADRB2</i>	109690	5q32-q34	?	Adrenergic mediated vascular dilatation. May contribute to beta-amyloid accumulation in Alzheimer disease (Zineh et al, 2004)
<i>ADRB3</i>	109691	8p12-p11.2	Located mainly in adipose tissue	Regulation of lipolysis and thermogenesis. Potential relevance of this receptor to obesity
<i>GNB3</i>	139130	12p13	Expressed in all tissues	Contribution to G protein activity. Susceptibility to hypertension
Sodic System				
<i>ADD1</i>	102680	4p16.3	Ubiquitous expression, kidneys ++	Ion transport. Susceptibility to hypertension (Zineh et al, 2004)
<i>SCNN1A</i>	600228	12p13	Nephrons	Supports sodium conductance. Susceptibility to hypertension
Arachidonic Acid Metabolism				
<i>LTC4S</i>	246530	5q35	Activity is present in eosinophils, basophils, mast cells, phagocytic mononuclear cells, endothelial cells, vascular smooth muscle cells, and platelets	Catalyzes the conjugation of LTA4 with reduced glutathione to form LTC4 (potent proinflammatory mediator)
Vasodilatation				
<i>NPPA</i>	108780	1p36.2	Atrial tissue, brain	Natriuretic-diuretic activity. Control of extracellular fluid volume & electrolyte homeostasis. Susceptibility to HT
<i>NOS2A</i>	163730	17cen-q11.2	Expressed in the liver, retina, bone cells and airway epithelial cells of the lung	Nitric oxide (NO) synthesis. NO is a messenger molecule with diverse functions such as blood pressure regulation. NOS2-derived NO is a prerequisite for cytokine signaling and function in innate immunity. Molecular synergism between NOS2 and COX2 may represent a major mechanism of inflammatory responses
<i>NOS3</i>	163729	7q36	Platelets, placenta, liver and kidney	NO synthesis. Variations in NOS3 seem to be associated with susceptibility to coronary spasm and might modulate blood pressure (Djuric et al, 2005)
COAGULATION				
<i>FII</i>	176930	11p11-q12	Liver	Converts soluble fibrinogen into insoluble strands of fibrin, and catalyzing many other coagulation-related reactions. Coagulation abnormalities
<i>FV</i>	227400	1q23	Liver	Essential cofactor for the factor Xa-catalyzed activation of prothrombin to the clotting enzyme thrombin. Coagulation abnormalities
<i>FVII</i>	227500	13q34	Liver	Initiate the process of coagulation in conjunction with tissue factor. Coagulation abnormalities

Symbol	OMIM	Gene Map Locus	Subcellular location (UniProt Knowledgebase except if indicated)	Roles and Disorders (OMIM except if indicated)
<i>FGB</i>	134830	4q28	Liver	Conversion into fibrin which is then cross linked by factor XIII to form a clot. Coagulation abnormalities
<i>ITGA2</i>	192974	5q23-q31	Liver, platelets	Plays a role in the attachment of a cell to the extracellular matrix (ECM) and to other cells, and in signal transduction from the ECM to the cell
<i>ITGB3</i>	173470	17q21.32	Liver, platelets	Adhesion and platelets aggregation
<i>PAI1</i>	173360	7q21.3-q22	Mainly endothelium	Fibrinolysis inhibitor through inhibition of tissue plasminogen activator and urokinase. Coagulation abnormalities
Homocystein metabolism				
<i>CBS</i>	236200	21q22.3	Strongly expressed in liver and pancreas, some expression in heart and brain, weak expression in lung and kidney	The reaction catalyzed by CBS is the committed step in the synthesis of cysteine from methionine by transsulfuration. Deficiency of CBS results in hyperhomocysteinemia, increased urinary homocysteine and methionine and with complications in the cardiovascular system leading to early and aggressive arterial disease
<i>MTHFR</i>	607093	1p36.3	widely expressed including lymph node, spleen, bone marrow (GENATLAS database http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/)	Catalyzes the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, a cosubstrate for homocysteine remethylation to methionine. Deficiency of MTHFR results in hyperhomocysteinuria. Polymorphism C577T and mild hyperhomocysteinemia are associated with neural tube defects in offspring, arterial and venous thrombosis and CV disease
OXYDATIVE STRESS				
<i>PON1</i>	168820	7q21.3	Expressed by the liver. Associated with HDL in the plasma	May mediate an enzymatic protection of LDL against oxidative modification and the consequent series of events leading to atheroma formation. Susceptibility to coronary artery disease (CAD) and to coronary artery spasm
<i>PON2</i>	602447	7q21.3	Widely expressed, with highest expression in liver, lung, placenta, testis and heart	Prevents LDL lipid peroxidation and reverses the oxidation of mildly oxidized LDL. Susceptibility to CAD
TRANSCRIPTION FACTORS				
<i>PPARG</i>	601487	3p25	Highest expression in adipose tissue. Lower in skeletal muscle, spleen, heart and liver. Also detectable in placenta, lung and ovary	Receptor that binds peroxisome proliferators such as hypolipidemic drugs and fatty acids. Controls the peroxisomal beta-oxidation pathway of fatty acids. Key regulator of adipocyte differentiation and glucose homeostasis. Obesity, diabetes mellitus, insulin resistance, lipodystrophy (modifier of abdominal body fat distribution)
<i>TCF7</i>	189908	5q31.1	Predominantly expressed in T- and NK-cells (Noble et al, 2003)	Activates genes involved in immune regulation and is a candidate locus for genetic susceptibility to type 1 diabetes. Affects expression of genes important to Th1 responses, such as the IL12R 2 subunit. Because type 1 diabetes is a Th1-mediated disease, TCF7 might reasonably be expected to influence type 1 diabetes (Noble et al, 2003)
<i>VDR</i>	601769	12q12-q14	Expressed in most tissues	Produces a variety of biologic effects. Mediates the action of vitamin D3 by controlling the expression of hormone sensitive genes. Effect on bone marrow density, susceptibility to osteoporosis, type 1 diabetes, grave's disease, ...
OTHERS				
<i>GC</i>	139200	4q12	Found on the surface of many cell types	Multifunctional protein. Major carrier protein of vitamin D in the circulation, and deglycosylation converts it into a very potent macrophage- and osteoclast-activating factor. Susceptibility to Graves disease, influence on glucose metabolism (might contribute to the development of type 2 diabetes)

CAD coronary artery disease, HT Hypertension

Supplementary table 2: Polymorphisms for which the seven cells are homozygote for the wild-type allele

Gene	SNP	SNP ID	Disorder associated with the mutated allele	Freq ^a	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
INFLAMMATION											
<i>CCR3</i>	PRO39leu	rs5742906	No data	0	W	W	W	W	W	W	W
<i>CCR5</i>	WT/del32 (wt/Δ580-611)	rs333	Lack of CCR5 expression. Protective effect against atherosclerosis initiation & reduced risk for severe CAD	0,05 ^b	W	W	W	W	W	W	W
<i>TNFA</i>	G-308a	rs1800629	Seems to be a predisposing factor for development of CAD in particular pathological settings associated with the disease itself, such as diabetes (Sbarsi et al, 2007)	0,22	W	W	W	W	W	W	W
CELLULAR ADHESION											
<i>ICAM1</i>	LYS56met	rs5491	No data	0,00	W	W	W	W	W	W	W
<i>ICAM1</i>	GLY241arg	rs1799969	Associated with lower sICAM-1 levels (Ponthieux et al, 2003) and lower risk of type 1 diabetes (Nejentsev et al, 2003). Also association with venous thrombosis events (Penco et al, 2005)	0,15	W	W	W	W	W	W	W
<i>SELE</i>	SER128arg	rs5361	Elevation of atherosclerosis risk. Associated with stroke history (Flex et al, 2004)	0.09	W	W	W	W	W	W	W
<i>SELE</i>	LEU554phe	rs5355	Higher risk for early severe atherosclerosis (Wenzel et al, 1996; Auer et al, 2003; Testa et al, 2006)	0.03	W	W	W	W	W	W	W
<i>CTLA4</i>	C-318t	rs5742909	Regulation of the expression of CTLA4 (Wang et al, 2002)	0.09	W	W	W	W	W	W	W
<i>MS4A2</i>	GLU237gly	rs569108	No significant data	0.04	W	W	W	W	W	W	W
LIPIDS AND LIPOPROTEINS METABOLISM											
<i>ABCB1</i>	T-129c	rs3213619	Associated with ABCB1 expression in placenta (Tanabe et al, 2001)	0,05	W	W	W	W	W	W	W
<i>ABCB1</i>	G-1A	rs2214102	No significant data (Leschziner et al, 2007)	0,13	W	W	W	W	W	W	W
<i>ABCB1</i>	G1199a	rs2229109	Aaeration of ABCB1 activity in vitro (Woodahl et al, 2004)	0,03	W	W	W	W	W	W	W
<i>APOAIV</i>	GLN360his	rs5110	Higher HDLc plasma level	0.06	W	W	W	W	W	W	W
<i>APOB</i>	ARG3500gln	rs5742904	Reduces affinity for receptors. Hypercholesterolemia	0.00	W	W	W	W	W	W	W
<i>APOCIII</i>	C3175g	rs5128	Higher TG and ApoC3 levels (Olivieri et al, 2002)	0.06 ^c	W	W	W	W	W	W	W
<i>CETP</i>	ASP442gly	rs2303790	Decreased plasma CETP mass and activity; increased HDLc concentrations	0.00	W	W	W	W	W	W	W
<i>CETP</i>	G(+1)a	rs5742907	CETP deficiency; increased and enlarged HDL	0.00	W	W	W	W	W	W	W
<i>LPL</i>	T-93g	rs1800590	Familial combined hyperlipidemia with decreased HDLc and increased TG levels	0.02	W	W	W	W	W	W	W
<i>LPL</i>	ASP9asn	rs1801177	Familial combined hyperlipidemia with decreased HDLc and increased TG levels. Higher diastolic blood pressure	no data	W	W	W	W	W	W	W

Gene	SNP	SNP ID	Disorder associated with the mutated allele	Freq ^a	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
<i>LPL</i>	ASN291ser	rs268	Familial combined hyperlipidemia with decreased HDLc and increased TG levels	0.01	W	W	W	W	W	W	W
BLOOD PRESSURE REGULATION											
<i>ADRB2</i>	THR164ile	rs1800888	Would represent a risk factor for elevated blood pressure in women (Sethi et al, 2005). However, no effects on CVD risk in other studies (Iaccarino et al, 2006; Leineweber et al, 2006; Barbato et al, 2007)	0,01	W	W	W	W	W	W	W
<i>SCNN1A</i>	TRP493arg	rs5742912	May be associated with higher risk of ischemic stroke (Vormfelde et al, 2007)	0.04	W	W	W	W	W	W	W
<i>NOS3</i>	C-690t	rs3918226	No data	0,21 ^d	W	W	W	W	W	W	W
HEMOSTASIS											
<i>FII</i>	G20210a	rs1799963	Elevated plasma prothrombin levels. Increased risk of venous thrombosis and ischemic stroke	no data	W	W	W	W	W	W	W
<i>FV</i>	ARG506gln	rs6025	Factor V deficiency. Susceptibility to thrombo-embolic events	0,01	W	W	W	W	W	W	W
<i>FVII</i>	(-)323 10bp del / ins	rs5742910	Associated with a reduction in the risk of MI	0.09 ^e	W	W	W	W	W	W	W
<i>FVII</i>	ARG353gln	rs6046	Reduction of activated factor VII activity & decreased risk of MI	0,12	W	W	W	W	W	W	W
TRANSCRIPTION FACTORS											
<i>PPARG</i>	PRO12ala	rs1801282	PRO: higher susceptibility to diabetes mellitus type II, obesity	0,08	W	W	W	W	W	W	W
<i>TCF7</i>	PRO19thr	No data	May represent a risk factor for type 1 diabetes (Noble et al, 2003)	0,12 (Noble et al, 2003)	W	W	W	W	W	W	W

Wild type allele (nucleotide or amino-acid) is written in capital letter and mutated allele in small letter

W: homozygous for the wild type allele; h: heterozygous; m: homozygous for the mutated allele

CAD: coronary artery disease, CVD: Cardiovascular disease, HDLc: HDL cholesterol, MI: myocardial infarction, TG: Triglycerides

^a mutated allele frequencies in Caucasians (HapMap except if indicated)

^b CAUC 1

^c PARC-ROCHESTER-PANEL

^d PGA_CEPH-PANEL

^e PGA-EUROPEAN-PANEL

Supplementary table 3: Genotypes for genes related to inflammation, cellular adhesion, growth and immune system

Gene	SNP	SNP ID	Disorder associated with the mutated allele	Freq ¹	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
INFLAMMATION											
<i>CCR2</i>	VAL62ile	rs1799864	Effects on HDL concentration. Reduced atherosclerosis susceptibility (Pai et al, 2006) & risk for severe coronary artery disease (CAD)	0,13 ²	h	W	h	W	h	h	W
<i>CCR5</i>	G-2454A	rs1799987	No data	0,44 ³	h	W	m	m	h	h	h
<i>CSF2</i>	ILE117thr	rs25882	No data	0,19	m	ND	W	W	W	W	W
<i>IL10</i>	C-571a	rs1800872	Associated with low IL-10 production rates. Significant association between haplotype containing this mutated allele and risk of coronary events	0,2	m	W	h	W	h	h	W
<i>IL13</i>	C4045t	rs1295686	No data	0,23	W	W	W	W	h	h	W
<i>IL1A</i>	C-889t	rs1800587	Associated with increase promoter activity	0,31	W	h	h	W	h	W	m
<i>IL1B</i>	Phe105Phe	rs1143634	No data	0,22	C/C	C/t	C/t	C/C	C/t	C/C	t/t
<i>IL4</i>	C-589t	rs2243250	Predictor of thromboembolic stroke	0,16	m	W	W	W	h	h	W
<i>IL4R</i>	SER478pro	rs1805015	Higher risk for large vessel stroke in children with sickle cell anemia	0,17	W	h	W	W	h	W	W
<i>IL4R</i>	Gln576arg	rs1801275	Susceptibility to allergic inflammatory disorders	0,23	h	h	W	W	m	W	h
<i>IL4R</i>	ILE50val	rs1805010	Decreased susceptibility to myocardial infarction (MI) in smokers	0,44	m	W	W	W	h	m	h
<i>IL5RA</i>	G-80a	rs2290608	Susceptibility to multiple sclerosis (Brassat et al, 2006)	0,308	W	m	h	W	W	h	W
<i>IL6</i>	G-572c	rs1800796	Associated with higher systolic blood pressure (Humphries et al, 2001)	0,04	m	W	W	W	W	m	W
<i>IL6</i>	G-174c	rs1800795	G allele: Higher IL6 level; susceptibility to diabetes mellitus insulin-dependent, associated with stroke history, insulin resistance and dyslipidemia (Flex et al, 2004; Hamid et al, 2005)	0,53	W	ND	m	h	W	W	h
<i>IL9</i>	THR113met	rs2069885	No data	0,11	W	W	W	h	h	W	W
<i>LTA</i>	A252g	rs909253	Affected transcription of LTA. Increased risk for MI (Ozaki et al, 2002)	0,36	h	W	W	W	W	W	W
<i>LTA</i>	THR26asn	rs1041981	Associated with increased risk for MI and with CAD (Ozaki et al, 2002)	0,36	h	W	W	W	W	W	W
<i>SCYA11</i>	ALA23thr	rs3744508	Significantly associated with risk of MI (Zee et al, 2004)	0,18	h	W	h	W	h	W	h
<i>SCYA11</i>	G-1328a	rs4795895	No data	0,16	W	W	W	m	h	W	h
<i>CXCL12</i>	G+800A	rs1801157	Lower SDF1 plasma concentrations. Lower susceptibility to atherosclerosis	0,18	W	W	h	W	h	h	W
<i>TNFA</i>	G-376a	rs1800750	Susceptibility to multiple sclerosis and to cerebral malaria (Fernandez-Arquero et al, 1999)	0,01	W	W	W	m	W	W	W
<i>TNFA</i> *	G-244a & G-238a	rs673/ rs361525	Type 2 diabetic patients carrying 238aa genotype might be more susceptible to diabetic complications such as atherosclerosis (Shiau et al, 2003)	0,0 & 0,07 ²	WW	WW	Wm	Wm	WW	WW	WW
<i>SCGB1A1</i>	G+38a	rs3741240	Lower plasma UGB levels	0,37	W	h	m	h	W	h	W

Supplementary table 3: continued

Gene	SNP	SNP ID	Disorder associated with the mutated allele	Freq ¹	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
CELLULAR ADHESION											
<i>MMP3</i>	A ₅ -1171A ₆	rs3025058	Lower stromelysin levels in arterial walls. Associated with increased risk of atherosclerosis and MI and hypertension (HT) (Djuric et al, 2005)	0,33 ²	h	h	W	h	h	m	W
<i>SELP</i>	SER330asn	rs6131	Predictor of CHD in whites (Volcik et al, 2007)	0,20	h	W	h	h	W	h	W
<i>SELP</i>	VAL640leu	rs6133	Predictor of thromboembolic stroke (Zee et al, 2004)	0,12	W	W	W	W	W	W	m
<i>VCAMI</i>	T-1594c	rs1041163	No data	0,08	W	W	W	h	h	h	W
GROWTH FACTORS											
<i>TGFB1</i>	C-509t	rs1800469	Increased plasma levels of TGFβ1 (Grainger et al, 1999). Increased risk of stroke (Sie et al, 2006)	0,31	h	W	W	W	W	W	W
IMMUNE SYSTEM											
<i>C3</i>	ARG102gly	rs2230199	Maybe associated with increased risk of developing MI in coronary heart disease (CHD) patients (Csaszar et al, 2001)	0,18	W	W	W	W	h	W	W
<i>C5</i>	VAL802ile	rs17611	No data	0,37	m	h	h	m	m	m	h
<i>CD14</i>	C-260t	rs2569190	May worsen atherosclerosis & associated with increased risk for non-lethal cardiovascular events (Bernardo et al, 2006; Porsch-Ozcurumez et al, 2006; Giacconi et al, 2007)	0,47	m	W	h	h	h	W	m
<i>CTLA4</i>	THR17ala	rs231775	Increased susceptibility to type I diabetes and to hypertension (Kokubo et al, 2006)	0,38	m	m	h	m	h	m	h

Wild type allele (nucleotide or amino-acid) is written in capital letter and mutated allele in small letter

W: homozygous for the wild type allele; h: heterozygous; m: homozygous for the mutated allele

CAD: coronary artery disease, CVD: cardiovascular disease, HT: hypertension, MI: myocardial infarction, ND: not determined

* Haplotype

¹ Mutated allele frequencies in Caucasians (HapMap except if indicated)

² PGA-EUROPEAN-PANEL

³ CAUC 1

⁴ PARC-ROCHESTER-PANEL

⁵ American Caucasians

⁶ PARC-EUROPEAN-PANEL

⁷ PGA_CEPH-PANEL

⁸ PGA-EUROPEAN-PANEL

Supplementary table 4: Genotypes for genes related to lipids and lipoproteins metabolism

Gene	SNP	SNP ID	Disorder associated with the mutated allele	Freq ¹	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
<i>ABCA1</i>	ARG219lys	rs2230806	Significantly more frequent in familial hypercholesterolemia (FH) patients without premature CHD than those with premature CHD. Associated with slightly higher HDL and lower prevalence of CAD (Benton et al, 2007)	0,16	W	W	W	W	h	W	W
<i>ABCA1</i>	ILE883met	rs4149313	Associated with higher HDL levels (Jensen et al, 2007)	0,13	W	W	W	W	h	W	W
<i>ABCA1</i>	LYS1587arg	rs2230808	LYS: Associated with decreased ApoA1 levels (Tregouet et al, 2004)	0,84	m	m	m	m	m	m	m
<i>ABCA1</i>	C-7t	rs1800977	No significant data	0.358	W	W	h	m	ND	W	W
<i>ABCA1</i>	G-395c	rs2246293	No significant data	no data	W	h	h	m	m	W	h
<i>ABCA1</i>	C-564t	rs2422493	Effect not clear: associated with increase risk for subclinical cardiovascular disease (Benton et al, 2007)but also with lower risk of CHD (Jensen et al, 2007)	no data	ND	h	h	m	m	W	h
<i>ABCG8</i>	THR400lys	rs4148217	Lower decrease in total cholesterol and LDLc in male under dietary changes (Hubacek et al, 2004)	0,25	W	W	W	W	W	W	m
<i>ABCG8</i>	TYR54cys	rs4148211	Lower decrease in total cholesterol and LDL in female under dietary change (Hubacek et al, 2004)	0,38	W	W	h	W	h	h	m
<i>ABCG8</i>	ALA632val	rs6544718	Associated with different plasma total cholesterol, LDL complex and ApoB in low-cholesterol consumers (Viturro et al, 2006)	0,21	W	W	W	W	h	W	W
<i>ABCB1</i>	G-1A	rs2214102	No significant data (Leschziner et al, 2007)	0,133	W	W	W	m	W	W	W
<i>ABCB1</i>	A61g	rs9282564	No significant data (Leschziner et al, 2007)	0,10	W	W	h	W	W	W	W
<i>ABCB1</i>	C1236t	rs1128503	Modifier of drugs pharmacokinetics (Bosch et al, 2006; Xing et al, 2006)	0,39	m	m	h	W	W	m	h
<i>ABCB1</i>	T-76a	rs1922242	No significant data (Leschziner et al, 2007)	0,43	W	W	h	m	h	W	h
<i>ABCB1</i>	G2677t/a	rs2032582	Modifier of drugs pharmacokinetics (Marzolini et al, 2004)	0.40	m	m	h	W	W	W	h
<i>ABCB1</i>	C3435t	rs1045642	Modifier of drugs pharmacokinetics (Marzolini et al, 2004)	0.54	m	m	h	m	W	h	h
<i>APOAIV</i>	THR347ser	rs675	Associated with lower TG and with lower ApoB, LDLC and total cholesterol	0,20	W	h	W	W	W	W	W
<i>APOB</i>	THR71ile	rs1367117	Associated with higher LDL, ApoB and TC (Pallaud et al, 2001)but also with lower blood pressure (Kokubo et al, 2006)	0.27	W	h	W	h	h	W	W

Supplementary table 4: continued

Gene	SNP	SNP ID	Disorder associated with the mutated allele	Freq ¹	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
<i>APOCIII</i>	C-641a	rs2542052	No significant data	no data	W	h	W	h	W	m	W
<i>APOCIII</i>	C-482t	rs2854117	Higher TG levels. Higher susceptibility to CAD (Lai et al, 2005)	0.29 ⁴	W	h	W	W	W	m	W
<i>APOCIII</i>	T-455c	rs2854116	Higher ApoC3 and TG levels. Higher susceptibility to CAD (Lai et al, 2005)	0.36 ⁴	W	h	W	h	W	m	W
<i>APOCIII</i>	C1100t	rs4520	Higher LDL, ApoB, TC and TG (Pallaud et al, 2001)	0.39 ⁴	W	W	m	h	h	W	m
<i>APOCIII</i>	T3206g	rs4225	Higher TG levels (Xu et al, 1994)	0.44 ⁴	h	W	m	m	h	m	m
<i>APOE</i> *	CYS112arg & ARG158cys	rs429358/ rs7412	ε2: increased risk to develop familial type III hyperlipoproteinemia & ε4: susceptibility to alzheimer disease and to CAD	0.15 & 0.09 ⁵	ε3/ε3	ε4/ε4	ε3/ε3	ε3/ε3	ε3/ε3	ε3/ε3	ε3/ε3
<i>CETP</i>	ILE405val	rs5882	Decreased CETP concentrations and activity and increased HDL concentrations (Barzilai et al, 2003)	0,31	h	W	h	h	W	W	h
<i>CETP</i> *	C-631a & C-629a	rs1800776/ rs1800775	-629a associated with lower CETP and maybe with higher HDLc (Thompson et al, 2003)	0,02 & 0,43 ⁴	CC/Ca	CC/aa	CC/Ca	CC/Ca	CC/Ca	CC/CC	CC/Ca
<i>LDLR</i>	<i>NcoI</i> +/-	rs5742911	Associated with small-vessel stroke risk in sickle cell anemia (Hoppe et al, 2004)	G: 0.32 ⁶	<i>NcoI</i> +/-	<i>NcoI</i> +/-	<i>NcoI</i> +/+	<i>NcoI</i> +/-	<i>NcoI</i> +/-	<i>NcoI</i> +/+	<i>NcoI</i> +/+
<i>LIPC</i>	C-480t	rs1800588	Higher HDLc (Andersen et al, 2003). Higher susceptibility to CHD	0.26	m	W	W	W	h	m	W
<i>LPL</i>	SER447ter	rs328	Lower LPL activity and hyperlipidemia but also associated with lower blood pressure (Kokubo et al, 2006)	0.13	h	W	W	h	W	m	W
<i>LPA</i>	C93t	rs1652503	Lower LPA concentrations. Lower susceptibility to atherosclerotic disease	no data	W	W	h	W	W	h	W

Supplementary table 5: Genotypes for genes related to blood pressure regulation

Gene	SNP	SNP ID	Disorder associated with the mutated allele	Freq ¹	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
Renin-Angiotensin system											
<i>ACE</i>	Alu element INS/del	rs1799752	Elevated ACE plasma level. Variation of ACE inhibitors efficacy & susceptibility to CVD	0.42 (Guo et al, 2005)	h	h	h	h	m	W	m
<i>AGT</i>	MET235thr	rs699	Effect on AGT plasma concentration & elevation susceptibility to CVD and HT	0.38	m	W	h	h	m	m	m
<i>AGTR1</i>	A1166c	rs5186	Susceptibility to CVD and HT	0,35 ⁶	W	W	W	W	h	W	h
Adrenergic-cholinergic receptors											
<i>ADRB2</i>	GLY16arg	rs1042713	GLY: associated with metabolic syndrome in men (Gjesing et al, 2007)	0,33	m	W	W	W	W	h	W
<i>ADRB2</i>	GLU27gln	rs1042714	GLU: associated with obesity and with metabolic syndrome in men (Dallongeville et al, 2003; Gjesing et al, 2007); risk factor for CAD (Barbato et al, 2007)	0,53	m	W	h	W	W	m	W
<i>ADRB3</i>	ARG64trp	rs1800888	ARG: would increase the capacity to gain weight	0,87 ⁷	m	m	m	m	h	m	W
<i>GNB3</i>	C825t	rs4994	Susceptibility to hypertension and to higher BMI (Weinstein et al, 2006)	0.39	m	h	h	W	W	m	h
Sodic system											
<i>ADD1</i>	GLY460trp	rs4961	Enhances tubular sodium reabsorption. Combination with ACE DD homozygosity worsened cardiovascular prognosis (Bianchi et al, 2005)	0.21	m	m	W	h	W	m	W
<i>SCNN1A</i>	ALA663thr	rs2228576	Would be associated with lower risk of HT (Vormfelde et al, 2007)	0,26	W	m	m	m	h	m	m
Arachidonic acid metabolism											
<i>LTC4S</i>	A-444c	rs730012	Associated with large vessel stroke risk in children with sickle cell anemia (Hoppe et al, 2007)	0.33	h	W	h	W	h	W	W
Vasodilatation											
<i>NOS2A</i>	C231t	rs1137933	Higher susceptibility to multiple sclerosis (Barcellos et al, 2004)	0.20	W	h	W	W	W	W	W
<i>NOS3</i>	A-948g	rs1800779	A: higher susceptibility to ischemic stroke (Howard et al, 2005)	0,39	W	W	h	h	h	W	W
<i>NOS3</i>	GLU298asp	rs1799983	Decrease NOS activity. Associated with susceptibility to coronary spasms, hypertension, ischemic heart disease and stroke risk (Berger et al, 2007)	0,34	W	W	m	m	h	W	W
<i>NPPA</i>	VAL7met	rs5063	Lower levels of ApoA1 and HDL in FH patients (Dedoussis et al, 2006). Association with CAD? (inconsistent results)	0.06	m	W	W	W	W	W	W
<i>NPPA</i>	T2238c	rs5065	Associated with CAD (myocardial infarction, stroke, atherosclerosis...) (Dedoussis et al, 2006)	0.15	W	W	W	W	h	W	W

Supplementary table 6: Genotypes for genes related to coagulation, pro-thrombosis, oxidative stress transcription and others

Gene	SNP	SNP ID	Disorder associated with the mutated allele	Freq ¹	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
THROMBOSIS											
<i>FGB</i>	G-455a	rs1800790	Increase in plasma fibrinogen. Associated with higher whole blood viscosity, may also be associated with cardiovascular risk	0.26	W	W	W	W	h	W	W
<i>ITGA2</i>	G873a	rs1062535	Associated with GP Ia/IIa surface expression & maybe with stroke risk	0,36	m	m	W	W	m	W	W
<i>ITGB3</i>	LEU33pro	rs5918	Frequently implicated in syndromes of immune-mediated platelet destruction. Susceptibility to CVD such as CAD	0.15	W	W	W	h	W	W	h
<i>PAII</i>	G ₅ -675G ₄		Increased PAII plasma level. Modest increased in MI risk	no data	W	W	W	m	W	ND	h
<i>PAII</i>	G11053t	rs7242	G: associated with higher MI risk and would affect BMI and plasma insulin levels	0,52	m	m	m	h	m	h	h
HOMOCYSTEIN METABOLISM											
<i>CBS</i>	ILE278thr	rs5742905	Homocysteinuria, Hyperhomocysteinemia	0,00	W	W	W	h	W	W	W
<i>MTHFR</i>	C677t	rs1801133	Reduced enzyme activity. Risk factor for vascular disease and maybe CAD	0.24	m	W	h	W	h	m	W
OXYDATIVE STRESS											
<i>PON1</i>	MET55leu	rs854560	Higher PON1 plasma concentration and activities. Independent risk factor for CVD	0,40	m	W	W	h	m	m	m
<i>PON1</i>	GLN192arg	rs662	Higher PON1 activity. Susceptibility to CAD and to coronary artery spasm	0,36	h	W	W	h	h	ND	h
<i>PON2</i>	SER311cys	rs7493	Protective against CAD or not? contradictory results	0,24	W	W	W	h	h	W	W
TRANSCRIPTION FACTORS											
<i>VDR</i>	MET1thr	rs2228570	increases transcriptional activity of VDR (Taverna et al, 2005). Associated with type I diabetes susceptibility (Marti et al, 2004; Zemunik et al, 2005; Capoluongo et al, 2006)	0,44	m	W	h	W	m	m	W
OTHERS											
<i>GC *</i>	ASP416glu & THR420lys	rs7041/ rs4588	416glu: Associated with higher susceptibility to type I diabetes (Ongagna et al, 2005)	0.58 & 0,23 ³	hW	Wm	hh	hh	hW	Wm	mW

REFERENCES

- Andersen RV, Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Schnohr P and Nordestgaard BG. Hepatic lipase mutations, elevated high-density lipoprotein cholesterol, and increased risk of ischemic heart disease: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41 (11): 1972-82.
- Auer J, Weber T, Berent R, Lassnig E, Lamm G and Eber B. Genetic polymorphisms in cytokine and adhesion molecule genes in coronary artery disease. *Am J Pharmacogenomics.* 2003; 3 (5): 317-28.
- Barbato E, Berger A, Delrue L, Van Durme F, Manoharan G, Boussy T, Heyndrickx GR, De Bruyne B, Ciampi Q, Vanderheyden M, Wijns W and Bartunek J. GLU-27 variant of beta2-adrenergic receptor polymorphisms is an independent risk factor for coronary atherosclerotic disease. *Atherosclerosis.* 2007; 194 (2): e80-6.
- Barcellos LF, Begovich AB, Reynolds RL, Caillier SJ, Brassat D, Schmidt S, Grams SE, Walker K, Steiner LL, Cree BA, Stillman A, Lincoln RR, Pericak-Vance MA, Haines JL, Erlich HA, Hauser SL and Oksenberg JR. Linkage and association with the NOS2A locus on chromosome 17q11 in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2004; 55 (6): 793-800.
- Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, Schaefer EJ, Cupples AL, Lipton R, Cheng S and Shuldiner AR. Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. *Jama.* 2003; 290 (15): 2030-40.
- Benton JL, Ding J, Tsai MY, Shea S, Rotter JI, Burke GL and Post W. Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis.* 2007; 193 (2): 352-60.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R and Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science.* 2000; 290 (5497): 1771-5.
- Berger K, Stogbauer F, Stoll M, Wellmann J, Hüge A, Cheng S, Kessler C, John U, Assmann G, Ringelstein EB and Funke H. The glu298asp polymorphism in the nitric oxide synthase 3 gene is associated with the risk of ischemic stroke in two large independent case-control studies. *Hum Genet.* 2007; 121 (2): 169-78.
- Bernardo E, Angiolillo DJ, Ramirez C, Cavallari U, Trabetti E, Sabate M, Hernandez R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Banuelos C, Costa MA, Bass TA, Pignatti PF, Macaya C and Fernandez-Ortiz A. Influence of the CD14 C260T promoter polymorphism on C-reactive protein levels in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2006; 98 (9): 1182-4.
- Bianchi G, Ferrari P and Staessen JA. Adducin polymorphism: detection and impact on hypertension and related disorders. *Hypertension.* 2005; 45 (3): 331-40.
- Bosch TM, Huitema AD, Doodeman VD, Jansen R, Witteveen E, Smit WM, Jansen RL, van Herpen CM, Soesan M, Beijnen JH and Schellens JH. Pharmacogenetic screening of CYP3A and ABCB1 in relation to population pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Cancer Res.* 2006; 12 (19): 5786-93.
- Brassat D, Motsinger AA, Caillier SJ, Erlich HA, Walker K, Steiner LL, Cree BA, Barcellos LF, Pericak-Vance MA, Schmidt S, Gregory S, Hauser SL, Haines JL, Oksenberg JR and Ritchie MD. Multifactor dimensionality reduction reveals gene-gene interactions associated with multiple sclerosis susceptibility in African Americans. *Genes Immun.* 2006; 7 (4): 310-5.
- Capoluongo E, Pitocco D, Concolino P, Santonocito C, Di Stasio E, d'Onofrio G, Manto A, Giardina B, Ghirlanda G, Ameglio F and Zuppi C. Slight association between type 1

- diabetes and "ff" VDR FokI genotype in patients from the Italian Lazio Region. Lack of association with diabetes complications. *Clin Biochem.* 2006; 39 (9): 888-92.
- Coll B, Alonso-Villaverde C, Parra S, Montero M, Tous M, Joven J and Masana L. The stromal derived factor-1 mutated allele (SDF1-3'A) is associated with a lower incidence of atherosclerosis in HIV-infected patients. *Aids.* 2005; 19 (16): 1877-83.
- Csaszar A, Duba J, Melegh B, Kramer J, Szalai C, Prohaszka Z, Karadi I, Kovacs M, Mehes K, Romics L and Fust G. Increased frequency of the C3*F allele and the Leiden mutation of coagulation factor V in patients with severe coronary heart disease who survived myocardial infarction. *Exp Clin Immunogenet.* 2001; 18 (4): 206-12.
- Dallongeville J, Helbecque N, Cottel D, Amouyel P and Meirhaeghe A. The Gly16-->Arg16 and Gln27-->Glu27 polymorphisms of beta2-adrenergic receptor are associated with metabolic syndrome in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88 (10): 4862-6.
- Dedoussis GV, Maumus S, Skoumas J, Choumerianou DM, Pitsavos C, Stefanadis C and Visvikis-Siest S. Natriuretic peptide Val7Met substitution and risk of coronary artery disease in Greek patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lab Anal.* 2006; 20 (3): 98-104.
- Djuric T, Zivkovic M, Stankovic A, Mecanic S and Alavantic D. Endothelial NOS G894 T and MMP-3 5A/6A gene polymorphisms and hypertension in Serbian population. *J Clin Lab Anal.* 2005; 19 (6): 241-6.
- Fernandez-Arquero M, Arroyo R, Rubio A, Martin C, Vigil P, Conejero L, Figueredo MA and de la Concha EG. Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis. *Neurology.* 1999; 53 (6): 1361-3.
- Flex A, Gaetani E, Papaleo P, Straface G, Proia AS, Pecorini G, Tondi P, Pola P and Pola R. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. *Stroke.* 2004; 35 (10): 2270-5.
- Giacconi R, Caruso C, Lio D, Muti E, Cipriano C, Costarelli L, Saba V, Gasparini N, Malavolta M and Mocchegiani E. CD14 C (-260)T polymorphism, atherosclerosis, elderly: role of cytokines and metallothioneins. *Int J Cardiol.* 2007; 120 (1): 45-51.
- Gjesing AP, Andersen G, Burgdorf KS, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Hansen T and Pedersen O. Studies of the associations between functional beta2-adrenergic receptor variants and obesity, hypertension and type 2 diabetes in 7,808 white subjects. *Diabetologia.* 2007; 50 (3): 563-8.
- Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND and Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet.* 1999; 8 (1): 93-7.
- Guo X, Cheng S, Taylor KD, Cui J, Hughes R, Quinones MJ, Bulnes-Enriquez I, De la Rosa R, Aurea G, Yang H, Hsueh W and Rotter JI. Hypertension genes are genetic markers for insulin sensitivity and resistance. *Hypertension.* 2005; 45 (4): 799-803.
- Hamid YH, Rose CS, Urhammer SA, Glumer C, Nolsoe R, Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Hansen T and Pedersen O. Variations of the interleukin-6 promoter are associated with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia.* 2005; 48 (2): 251-60.
- Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L, Girard T, Vichinsky E and Styles L. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood.* 2004; 103 (6): 2391-6.
- Hoppe C, Klitz W, D'Harlingue K, Cheng S, Grow M, Steiner L, Noble J, Adams R and Styles L. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Stroke.* 2007; 38 (8): 2241-6.

- Howard TD, Giles WH, Xu J, Wozniak MA, Malarcher AM, Lange LA, Macko RF, Basehore MJ, Meyers DA, Cole JW and Kittner SJ. Promoter polymorphisms in the nitric oxide synthase 3 gene are associated with ischemic stroke susceptibility in young black women. *Stroke*. 2005; 36 (9): 1848-51.
- Hubacek JA, Berge KE, Stefkova J, Pitha J, Skodova Z, Lanska V and Poledne R. Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels. *Physiol Res*. 2004; 53 (4): 395-401.
- Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E and Miller GJ. The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J*. 2001; 22 (24): 2243-52.
- Iaccarino G, Izzo R, Trimarco V, Cipolletta E, Lanni F, Sorriento D, Iovino GL, Rozza F, De Luca N, Priante O, Di Renzo G and Trimarco B. Beta2-adrenergic receptor polymorphisms and treatment-induced regression of left ventricular hypertrophy in hypertension. *Clin Pharmacol Ther*. 2006; 80 (6): 633-45.
- Jensen MK, Pai JK, Mukamal KJ, Overvad K and Rimm EB. Common genetic variation in the ATP-binding cassette transporter A1, plasma lipids, and risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2007; 195 (1): e172-80.
- Kokubo Y, Tomoike H, Tanaka C, Banno M, Okuda T, Inamoto N, Kamide K, Kawano Y and Miyata T. Association of sixty-one non-synonymous polymorphisms in forty-one hypertension candidate genes with blood pressure variation and hypertension. *Hypertens Res*. 2006; 29 (8): 611-9.
- Lai CQ, Parnell LD and Ordovas JM. The APOA1/C3/A4/A5 gene cluster, lipid metabolism and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol*. 2005; 16 (2): 153-66.
- Leineweber K, Tenderich G, Wolf C, Wagner S, Zittermann A, Elter-Schulz M, Moog R, Muller N, Jakob HG, Korfer R, Philipp T, Heusch G and Brodde OE. Is there a role of the Thr164Ile-beta(2)-adrenoceptor polymorphism for the outcome of chronic heart failure? *Basic Res Cardiol*. 2006; 101 (6): 479-84.
- Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M and Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J*. 2007; 7 (3): 154-79.
- Marti G, Audi L, Esteban C, Oyarzabal M, Chueca M, Gussinye M, Yeste D, Fernandez-Cancio M, Andaluz P and Carrascosa A. [Association of vitamin D receptor gene polymorphism with type 1 diabetes mellitus in two Spanish populations]. *Med Clin (Barc)*. 2004; 123 (8): 286-90.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T and Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*. 2004; 75 (1): 13-33.
- Nejentsev S, Guja C, McCormack R, Cooper J, Howson JM, Nutland S, Rance H, Walker N, Undlien D, Ronningen KS, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Ionescu-Tirgoviste C, Gale EA, Bingley PJ, Gillespie KM, Savage DA, Carson DJ, Patterson CC, Maxwell AP and Todd JA. Association of intercellular adhesion molecule-1 gene with type 1 diabetes. *Lancet*. 2003; 362 (9397): 1723-4.
- Noble JA, White AM, Lazzeroni LC, Valdes AM, Mirel DB, Reynolds R, Grupe A, Aud D, Peltz G and Erlich HA. A polymorphism in the TCF7 gene, C883A, is associated with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52 (6): 1579-82.
- Olivieri O, Stranieri C, Bassi A, Zaia B, Girelli D, Pizzolo F, Trabetti E, Cheng S, Grow MA, Pignatti PF and Corrocher R. ApoC-III gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *J Lipid Res*. 2002; 43 (9): 1450-7.

- Ongagna JC, Pinget M and Belcourt A. Vitamin D-binding protein gene polymorphism association with IA-2 autoantibodies in type 1 diabetes. *Clin Biochem.* 2005; 38 (5): 415-9.
- Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y and Tanaka T. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet.* 2002; 32 (4): 650-4.
- Pai JK, Kraft P, Cannuscio CC, Manson JE, Rexrode KM, Albert CM, Hunter D and Rimm EB. Polymorphisms in the CC-chemokine receptor-2 (CCR2) and -5 (CCR5) genes and risk of coronary heart disease among US women. *Atherosclerosis.* 2006; 186 (1): 132-9.
- Pallaud C, Gueguen R, Sass C, Grow M, Cheng S, Siest G and Visvikis S. Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas Cohort. *J Lipid Res.* 2001; 42 (11): 1879-90.
- Penco S, Grossi E, Cheng S, Intraligi M, Maurelli G, Patrosso MC, Marocchi A and Buscema M. Assessment of the role of genetic polymorphism in venous thrombosis through artificial neural networks. *Ann Hum Genet.* 2005; 69 (Pt 6): 693-706.
- Ponthieux A, Lambert D, Herbeth B, Drosch S, Pfister M and Visvikis S. Association between Gly241Arg ICAM-1 gene polymorphism and serum sICAM-1 concentration in the Stanislas cohort. *Eur J Hum Genet.* 2003; 11 (9): 679-86.
- Porsch-Ozcurumez M, Hucke J, Westphal S, Hubacek JA, Schmitz G and Luley C. A post-hoc analysis on the CD14 C(-260)T promoter polymorphism and coronary heart disease. *Physiol Res.* 2006.
- Quinones MP, Martinez HG, Jimenez F, Estrada CA, Dudley M, Willmon O, Kulkarni H, Reddick RL, Fernandes G, Kuziel WA, Ahuja SK and Ahuja SS. CC chemokine receptor 5 influences late-stage atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2007.
- Sbarsi I, Falcone C, Boiocchi C, Campo I, Zorzetto M, De Silvestri A and Cuccia M. Inflammation and atherosclerosis: the role of TNF and TNF receptors polymorphisms in coronary artery disease. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007; 20 (1): 145-54.
- Sethi AA, Tybjaerg-Hansen A, Jensen GB and Nordestgaard BG. 164Ile allele in the beta2-Adrenergic receptor gene is associated with risk of elevated blood pressure in women. The Copenhagen City Heart Study. *Pharmacogenet Genomics.* 2005; 15 (9): 633-45.
- Shiau MY, Wu CY, Huang CN, Hu SW, Lin SJ and Chang YH. TNF-alpha polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in Taiwanese patients. *Tissue Antigens.* 2003; 61 (5): 393-7.
- Shijubo N, Kawabata I, Sato N and Itoh Y. Clinical aspects of Clara cell 10-kDa protein/ uteroglobin (secretoglobin 1A1). *Curr Pharm Des.* 2003; 9 (14): 1139-49.
- Sie MP, Uitterlinden AG, Bos MJ, Arp PP, Breteler MM, Koudstaal PJ, Pols HA, Hofman A, van Duijn CM and Witteman JC. TGF-beta 1 polymorphisms and risk of myocardial infarction and stroke: the Rotterdam Study. *Stroke.* 2006; 37 (11): 2667-71.
- Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N and Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 297 (3): 1137-43.
- Taverna MJ, Selam JL and Slama G. Association between a protein polymorphism in the start codon of the vitamin D receptor gene and severe diabetic retinopathy in C-peptide-negative type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90 (8): 4803-8.
- Testa A, Benedetto FA, Spoto B, Pisano A, Tripepi G, Mallamaci F, Malatino LS and Zoccali C. The E-selectin gene polymorphism and carotid atherosclerosis in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21 (7): 1921-6.

- Thompson JF, Lira ME, Durham LK, Clark RW, Bamberger MJ and Milos PM. Polymorphisms in the CETP gene and association with CETP mass and HDL levels. *Atherosclerosis*. 2003; 167 (2): 195-204.
- Tregouet DA, Ricard S, Nicaud V, Arnould I, Soubigou S, Rosier M, Duverger N, Poirier O, Mace S, Kee F, Morrison C, Deneffe P, Tiret L, Evans A, Deleuze JF and Cambien F. In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24 (4): 775-81.
- Vituro E, de Oya M, Lasuncion MA, Gorgojo L, Moreno JM, Benavente M, Cano B and Garces C. Cholesterol and saturated fat intake determine the effect of polymorphisms at ABCG5/ABCG8 genes on lipid levels in children. *Genet Med*. 2006; 8 (9): 594-9.
- Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, Folsom AR and Boerwinkle E. Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis*. 2007; 195 (1): e76-82.
- Vormfelde SV, Sehrt D, Toliat MR, Schirmer M, Meineke I, Tzvetkov M, Nurnberg P and Brockmoller J. Genetic variation in the renal sodium transporters NKCC2, NCC, and ENaC in relation to the effects of loop diuretic drugs. *Clin Pharmacol Ther*. 2007; 82 (3): 300-9.
- Wang XB, Zhao X, Giscombe R and Lefvert AK. A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. *Genes Immun*. 2002; 3 (4): 233-4.
- Weinstein LS, Chen M, Xie T and Liu J. Genetic diseases associated with heterotrimeric G proteins. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27 (5): 260-6.
- Wenzel K, Ernst M, Rohde K, Baumann G and Speer A. DNA polymorphisms in adhesion molecule genes--a new risk factor for early atherosclerosis. *Hum Genet*. 1996; 97 (1): 15-20.
- Woodahl EL, Yang Z, Bui T, Shen DD and Ho RJ. Multidrug resistance gene G1199A polymorphism alters efflux transport activity of P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 310 (3): 1199-207.
- Xing Q, Gao R, Li H, Feng G, Xu M, Duan S, Meng J, Zhang A, Qin S and He L. Polymorphisms of the ABCB1 gene are associated with the therapeutic response to risperidone in Chinese schizophrenia patients. *Pharmacogenomics*. 2006; 7 (7): 987-93.
- Xu CF, Talmud P, Schuster H, Houlston R, Miller G and Humphries S. Association between genetic variation at the APO AI-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidaemia. *Clin Genet*. 1994; 46 (6): 385-97.
- Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, Su EW and Wang J. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*. 2006; 374: 174-9.
- Zee RY, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Lee RT and Ridker PM. Threonine for alanine substitution in the eotaxin (CCL11) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2004; 175 (1): 91-4.
- Zee RY, Cook NR, Cheng S, Reynolds R, Erlich HA, Lindpaintner K and Ridker PM. Polymorphism in the P-selectin and interleukin-4 genes as determinants of stroke: a population-based, prospective genetic analysis. *Hum Mol Genet*. 2004; 13 (4): 389-96.
- Zemunik T, Skrabac V, Boraska V, Diklic D, Terzic IM, Capkun V, Peruzovic M and Terzic J. FokI polymorphism, vitamin D receptor, and interleukin-1 receptor haplotypes are associated with type 1 diabetes in the Dalmatian population. *J Mol Diagn*. 2005; 7 (5): 600-4.

Zineh I, Beitelshees AL, Gaedigk A, Walker JR, Pauly DF, Eberst K, Leeder JS, Phillips MS, Gelfand CA and Johnson JA. Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 76 (6): 536-44.

Elise Jeannesson. Doctorat d'Université.

Titre de la thèse : Analyse génomique et transcriptomique du transporteur ABCB1 en physiopathologie cardiovasculaire.

RESUME

ABCB1 est une protéine impliquée dans le transport des médicaments mais aussi probablement du cholestérol. Des phénomènes de résistance médicamenteuse sont associés à ses polymorphismes et à des modulations de son expression via le facteur PXR. Notre objectif était de réaliser une analyse génomique et transcriptomique d'ABCB1 basée sur ces hypothèses : 1) les variants d'*ABCB1* expliquent-ils une part de la variabilité des taux de lipides et de lipoprotéines plasmatiques ? 2) le profil d'expression d'ABCB1 dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) constitue-t-il un biomarqueur cardiovasculaire nouveau ?

Nous avons déterminé la prévalence de polymorphismes d'*ABCB1* chez 371 sujets de la cohorte STANISLAS. Nous montrons que ces variants modulent les concentrations en lipides des sujets sains. Des associations significatives avec les lipides sont aussi notées chez des sujets à haut risque cardiovasculaire. Nous observons qu'une majorité d'enzymes du métabolisme des xénobiotés et de facteurs de transcription sont exprimés dans les PBMCs de sujets sains. Nous montrons par RTPCR qu'*ABCB1* et PXR sont exprimés dans les PBMCs de 83 sujets de la cohorte. Enfin, il n'y a pas d'association entre l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs et le taux de lipides plasmatiques chez le sujet sain.

En conclusion, les polymorphismes d'*ABCB1* peuvent moduler le taux de lipides et d'apolipoprotéines. Nous ne pouvons toutefois pas proposer l'expression d'ABCB1 dans les PBMCs comme biomarqueur du risque cardiovasculaire. Il serait intéressant de reproduire cette étude chez des sujets à risque cardiovasculaire élevé ou d'utiliser un modèle in vitro permettant d'induire l'expression d'ABCB1.

Mots clé : ABCB1, PXR, lipides, polymorphismes, expression, PBMCs.

Elise Jeannesson. Doctorat d'Université.

Title : Genomic and transcriptomic analysis of ABCB1 transporter in cardiovascular pathophysiology.

SUMMARY

ABCB1 is an ubiquitously expressed membrane transporter. Resistance to drugs is associated with genetic variations of its gene and with modulation of its expression through the PXR transcription factor. Given that ABCB1 could also transport cholesterol, our goal was to conduct a genomic and transcriptomic analysis of ABCB1 based on the following hypotheses: 1) *ABCB1* variants would partly explain plasma lipid and apolipoprotein concentrations, and 2) ABCB1 expression profile in PBMCs would be a new, and easily available, cardiovascular biomarker.

We have determined frequency of *ABCB1* variants in 371 subjects from the STANISLAS cohort. We have shown in these healthy people that *ABCB1* variants modulate lipid concentrations, sometimes in a sex-dependant manner. Significant associations were also observed in subjects with a high cardiovascular risk. In addition, DNA microarray analysis showed that most of the xenobiotic metabolizing enzymes and transcription factors are constitutively expressed in PBMCs of healthy subjects. ABCB1 and PXR were measured by quantitative RT-PCR in 83 subjects from the STANISLAS cohort. They are both expressed in PBMCs but their expressions do not correlate. Finally, there is no association between ABCB1, or PXR, expression in PBMCs and lipid plasma concentrations in healthy subjects.

To conclude, ABCB1 variants would modulate lipid and apolipoprotein concentrations. However, from our results, we cannot propose ABCB1 expression in PBMCs as a biomarker of cardiovascular risk. It would be of interest to reproduce this study in PBMCs of people at high cardiovascular risk or in an in vitro model of PBMCs with induction studies of ABCB1 expression.

Keywords: ABCB1, PXR, lipids, polymorphisms, expression, PBMCs.