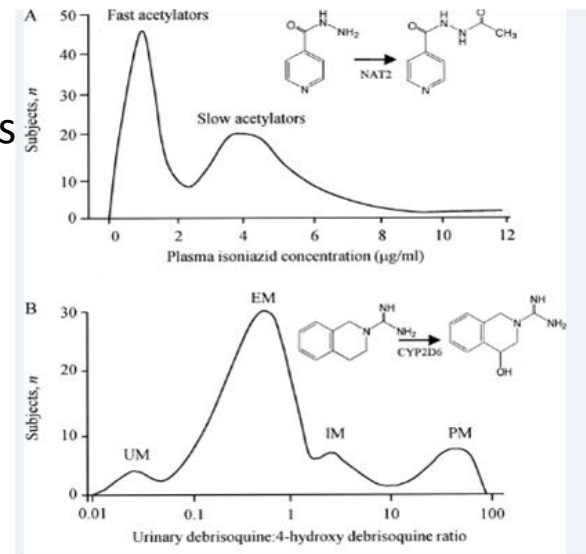


Université de Jijel
Faculté SNV
Département de Biologie moléculaire et
cellulaire

Pharmacologie-toxicogenetique

Master I : Sciences Pharmacologiques
Dr. Lahouel Asma



Phenotypage et genotypage

Approches méthodologiques utilisées pour déterminer la variabilité interindividuelle de la réponse aux xenobiotiques (médicaments).

Le phénotypage

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

Les méthodes de phénotypage reposent sur **une mesure directe de l'activité enzymatique** ou, le plus souvent, sur l'administration d'un **substrat-test** (en général un médicament), suivie d'une mesure des quantités de substrat résiduelles et/ou de leurs métabolites.

après l'administration et l'absorption d'une dose sub-thérapeutique du **médicament-test** un échantillon biologique, urinaire ou sanguin le plus souvent, est recueilli (*le temps de la prise d'échantillon est déterminé en fonction de la pharmacocinétique du substrat test*), et une quantification du substrat et de son (ou ses) métabolite(s) est réalisée à l'aide de **méthodes chromatographiques** essentiellement (HPLC, CPG).

Dans le cas le plus général, on détermine alors le rapport métabolique entre la quantité de substance retrouvée sous forme inchangée et celle d'un (ou plusieurs) métabolite(s), ce rapport étant le reflet de l'activité enzymatique étudiée, qui va ensuite permettre d'attribuer un phénotype (**Metaboliseur: rapide, intermédiaire, lent ou ultrarapide**).

Lorsque l'administration directe du médicament-test à l'individu n'est pas envisageable (**exemple des médicaments immunosuppresseurs potentiellement toxiques**), ces tests de phénotypage *in vivo* peuvent être remplacés par des tests *ex vivo*, par mesure directe de l'activité enzymatique sur un tissu facilement accessible comme les érythrocytes ou les leucocytes. En fait, cette approche serait préférable à la méthode par administration d'un médicament-test.

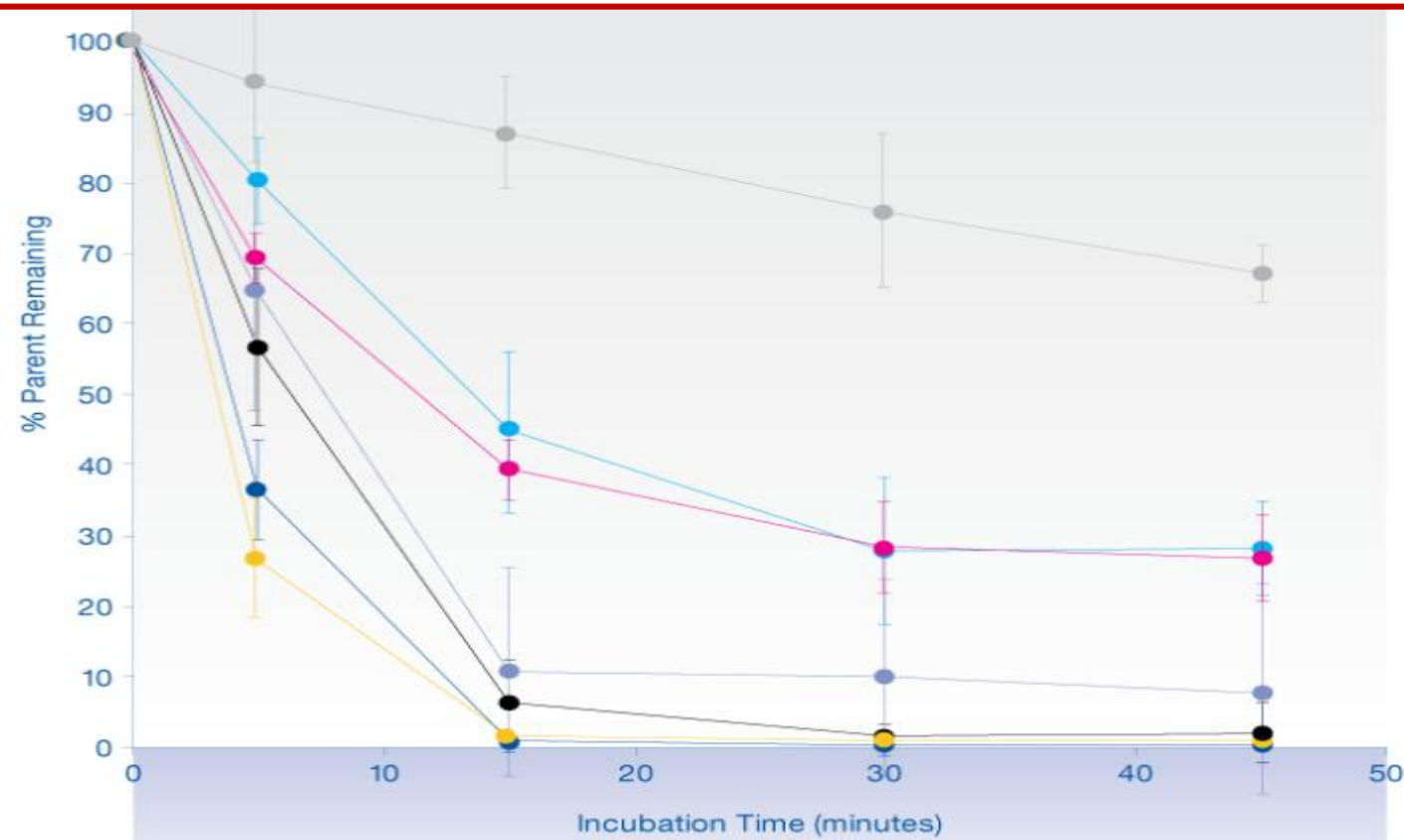
Malheureusement, la grande majorité des enzymes présentant un intérêt en pharmacogénétique est peu ou pas exprimée dans les tissus facilement accessibles.

TABLE 16.2 Major Parameters in Phenotype Measurement

Substrate Probe	Metabolite(s) Measured	Matrix	Time (h)	Extraction Method	Sample Detection Method
Multiple probes for each CYP450 Isoform (e.g., caffeine or phenacetin for CYP1A2)	Most abundant metabolite (e.g., paraxanthine for caffeine)	Urine	Often varies by study (e.g., 4, 6, 8, 10, 12)	Solid-phase	HPLC with different detection (ex. UV)
	Several metabolites (e.g. paraxanthine, and 1,7 dimethylu- racil)	Saliva		Liquid/liquid extraction	GC with different detection (ex. FID)
	All identified metabolites	Serum		On-column cleanup	GC MS or GC MS/ MS
		Plasma		Direct injection	HPLC MS or HPLC MS/MS

Substrats des CYP450

	CYP1A2	CYP2B6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
Substrates	Caffeine Imipramine Tacrine Theophylline R-warfarin	Bupropion Midazolam Tamoxifen Verapamil Testosterone	Diclofenac Losarten Phenytoin Tolbutamide S-warfarin	Omeprazole Phenytoin Indomethacin R-warfarin	Bufuralol Codeine Desipramine Lidocaine	Acetaminophen Ethanol Chlorzoxazone Sevoflurane	Nifedipine Erythromycin Midazolam Testosterone
Inhibitors	Ciprofloxacin Furafylline Mibefradil Ticlopidine	Ketoconazole Tranylcypromine Troglitazone Orphenadrine	Fluconazole Isoniazid Sulfaphenazole Paroxetine	Cimetidine Ketoconazole Paroxetine Ticlopidine	Quinidine Methadone Cimetidine Fluoxetine	Disulfiram	Ketoconazole Erythromycin Grapefruit juice Ritonavir
Inducers	Insulin Omeprazole (Cruciferous vegetables) (Char-grilled meat) (Tobacco)	Dexamethasone Phenobarbital Rifampin Sodium valproate	Rifampin Secobarbital	Prednisone Rifampin	None identified	Ethanol Isoniazid (Starvation)	Carbamazepine Phenobarbital Phenytoin Rifampin



- CYP1A2; Ethoxycoumarin
- CYP2C8; Amodiaquine
- CYP2B6; Efavirenz
- CYP2C9; Diclofenac
- CYP2C19; Diazepam
- CYP2D6; Dextromethorphan
- CYP3A4; Testosterone

Le graph montre le pourcentage de composé parent restant après l'incubation des substrats test avec les isoformes du cytochrome P450. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de 4 expériences distinctes.

***Phénotypage du CYP2D6 par le dextrométhorphan**

CYP2D6 phenotyping with dextromethorphan (Wojtczak et al.,2007)

Abstract:

Genetically determined individual differences in the ability to oxidize certain drugs have raised recently a considerable interest because of clinical importance of this problem. Determination of CYP2D6 oxidation phenotype is used to obtain more efficient pharmacotherapy and to explain lower efficacy of some drugs and presentation of adverse effects in particular patients.

The aim of this study was to identify the CYP2D6 oxidation phenotype with dextromethorphan (DM) as a probe drug. The study included 85 healthy volunteers of Polish origin. DM (40 mg) was given orally to healthy adults and 10-h urine samples were collected. DM and the metabolite dextrorphan (DX) were analyzed by the HPLC method. Phenotyping was performed using the metabolic ratio (MR) calculated as the urinary DM/DX output.

Based on the metabolic ratio, we can distinguish extensive (EM) and poor (PM) metabolizers in human population. Individuals with a dextromethorphan MR greater than 0.3 ($\log > -0.5$) were classified as PMs.

In our study, the frequency of the PM phenotype was 9.4%, which is in the range found in other Caucasian populations (3–10%).

Key words:

dextromethorphan, CYP2D6, phenotyping

Tab. 1. Distribution of the urinary dextromethorphan/dextorphan ratio in 85 healthy Polish subjects

	Sample size	PM	EM
Females	58	4 (6.9%) (95% C.I. 4–13.4%) MR = 0.612 ± 0.132 range (0.428–0.716) log MR = -0.222 ± 0.103 range (-0.368) to (-0.145)	54 (93.1%) (95% C.I. 86.6–99.6%) MR = 0.055 ± 0.050 range (0.004–0.207) log MR = -1.443 ± 0.436 range (-2.398) to (-0.684)
Males	27	4 (14.8%) (95% C.I. 10–19.6%) MR = 1.642 ± 0.740 range (0.711–2.377) log MR = 0.174 ± 0.234 range (-0.148) to (+0.376)	23 (85.2%) (95% C.I. 80.4–90%) MR = 0.06 ± 0.043 range (0.01–0.182) log MR = -1.342 ± 0.348 range (-1.921) to (-0.740)
Total	85	8 (9.4%) (95% C.I. 3.2–15.6%) MR = 1.127 ± 0.738 range (0.428–2.377) log MR = -0.025 ± 0.270 range (-0.368) to (+0.376)	77 (90.6%) (95% C.I. 84.4–96.8%) MR = 0.057 ± 0.047 range (0.004–0.207) log MR = -1.413 ± 0.412 range (-2.398) to (-0.684)

95 % C.I. –95 % confidence interval, MR – metabolic ratio, PM – poor metabolizer, EM –extensive metabolizer, $\chi^2 = 2.91$ (χ^2 tab 3.84, $p = 0.05$)

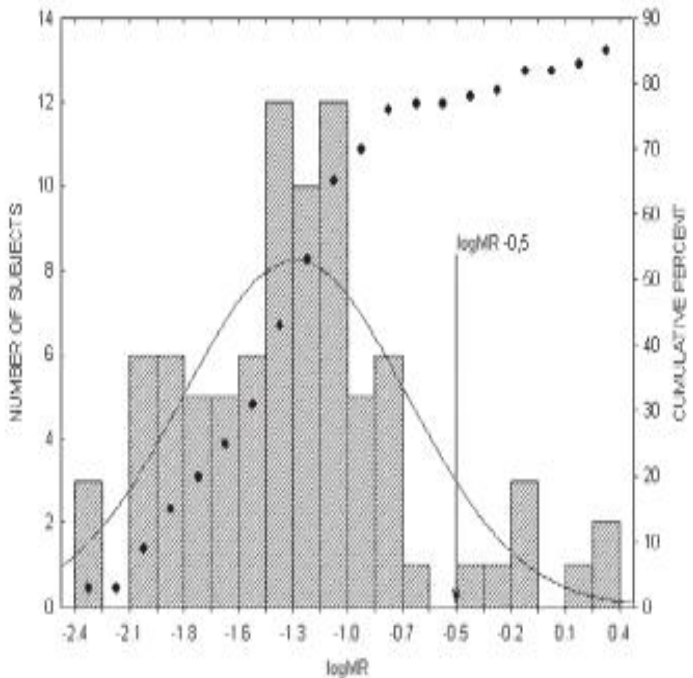


Fig. 1. Frequency distribution histogram of dextromethorphan log MR and cumulative probit plot among 85 Polish subjects

***Phénotypage du NAT2 par l'isoniazid (NIH)**

Isoniazid acetylation phenotyping in Saudi Arabs (Matar et al., 2004)

The study was designed to investigate the acetylator status in Saudi Arabs. Methods: Isoniazid (INH) acetylation phenotyping was studied in 136 Saudi Arabs in Riyadh, Saudi Arabia, using a single plasma sample taken 3 h post-INH oral dose of 200mg analysed by HPLC. Metabolic ratio (MR) of plasma acetyl-INH (Ac-INH) to INH was used to determine the acetylation phenotype. Acetylator phenotype was determined from the metabolic ratio (MR) of Ac-INH to INH in the plasma sample. Subjects with $MR < 1.0$ were then classified as slow acetylators and conversely, $MR > 1.0$ as fast acetylators.

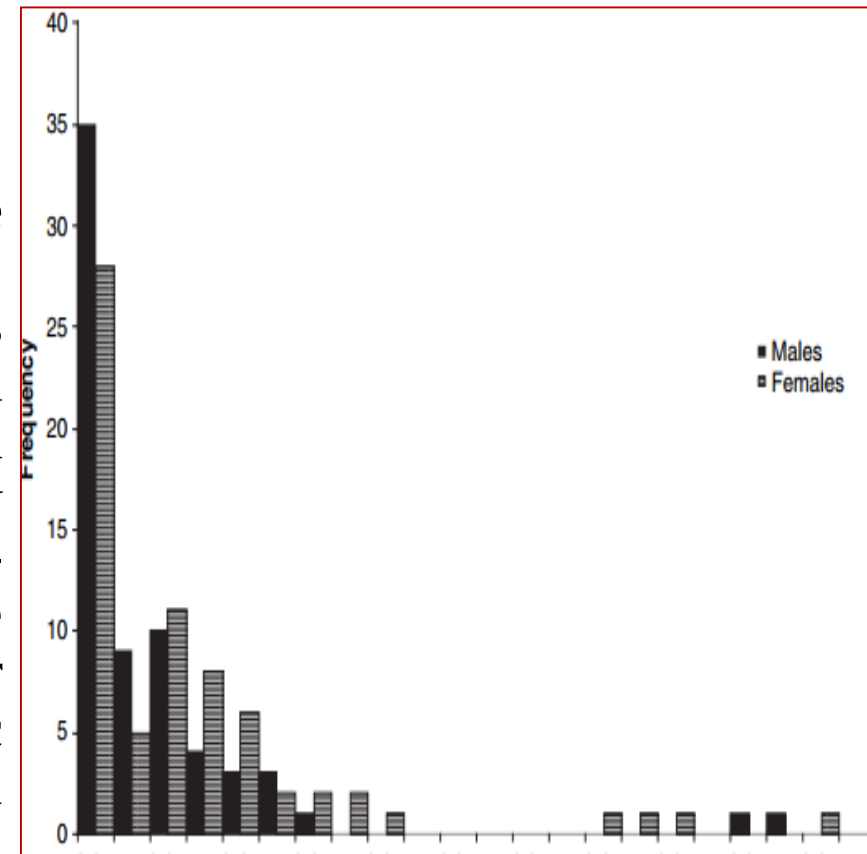


Fig. 1. Frequency distribution plasma Ac-INH/INH ratios in

Phenotypage de la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT)

*Enzyme intervient dans le métabolisme des médicaments thiopuriniques regroupant l'azathioprine (AZA) [Imurel®], la 6-mercaptopurine (6-MP) [Purinéthol®] et la 6-thioguanine (Lanvis®). Ces médicaments sont utilisés, d'une part, pour leurs propriétés cytotoxiques dans le traitement de certaines leucémies (en particulier la leucémie aiguë lymphoblastique infantile) et, d'autre part, pour leurs propriétés immunosuppressives, dans la prévention du rejet de greffe et le traitement de maladies inflammatoires chroniques. La (TPMT) permet la conversion de la 6-MP en 6-méthylmercaptopurine, **un métabolite inactif**.

***Lors de phénotypage la mesure d'activité est réalisée directement à partir d'un lysat érythrocytaire.**

***Chez les patients devant commencer un traitement par la thiopurine, il est recommandé de déterminer le phénotype ou le génotype de TPMT pour sélectionner la posologie initiale de thiopurine particulièrement, chez les individus déficients en TPMT afin d'éviter les effets toxiques**

Phenotypage de l'activité de TPMT en Ex vivo

Freeze 200µl whole blood at -80°C for 15 minutes. Add 600µl buffer and mix to produce a whole blood lysate

Determine lysate haemoglobin concentration



Incubate 200µl of lysate with 500ul of test reagent for exactly 1 hour at 37°C



Stop the reaction by heat inactivation at 95°C for 10 minutes



Centrifuge vials to produce a clear supernatant



Measure 6MTG by HPLC fluorimetry



nmol/6MTG/gHb/h

TPMT Deficient	<5
Low Activity	6-24
Normal Activity	25-55
High activity	>55

Inconvénients du phénotypage

Les méthodes de phénotypage possèdent un certain nombre d'inconvénients qui en limitent l'utilisation en routine. L'absence de substrat-test spécifique ou la survenue d'effets indésirables liés à son administration, la difficulté d'interpréter la valeur du rapport métabolique en cas de coadministrations de médicaments (interactions médicamenteuses) ou chez un individu aux fonctions hépatiques et rénales altérées sont autant des limitations à l'utilisation de ces tests.

De plus le phénotypage est applicable seulement dans le domaine des polymorphismes affectant la cinétique des médicaments , particulièrement les enzymes du métabolisme.

Génotypage

Pour pallier ces inconvénients, des méthodes de génotypage permettant la prédiction du phénotype des individus ont été développées

Genotypage: *approche méthodologique pour identifier les variants génétiques .*

En pharmacogénétique le genotypage est basé sur l'identification directe des **variabilités génétiques** à l'origine de la variabilité d'expression et d'activité de la protéine étudiée.

Méthodes de génotypage

La méthode et la stratégie de génotypage appliquées prendre en considération certain nombre de paramètres, tel que la **nature des variant à identifier** (mutations ponctuelles, délétion ou amplification du gène) et le nombre de mutations à identifier). La stratégie adoptée tient également compte du **contexte recherche (analyse de distribution des mutation dans les population ou identification de nouvelles mutations)** ou **clinique** dans lequel le test est prescrit, à savoir dans un cadre purement préventif, avant l'introduction d'un traitement médicamenteux chez les patients à risque (phénotype non connu *a priori*) ou dans un cadre diagnostique pour expliquer un accident iatrogène ou une absence de réponse à un médicament donné.

les méthodes de génotypage reposent sur l'utilisation des outils issus de la biologie moléculaire (manipulation de L'ADN).

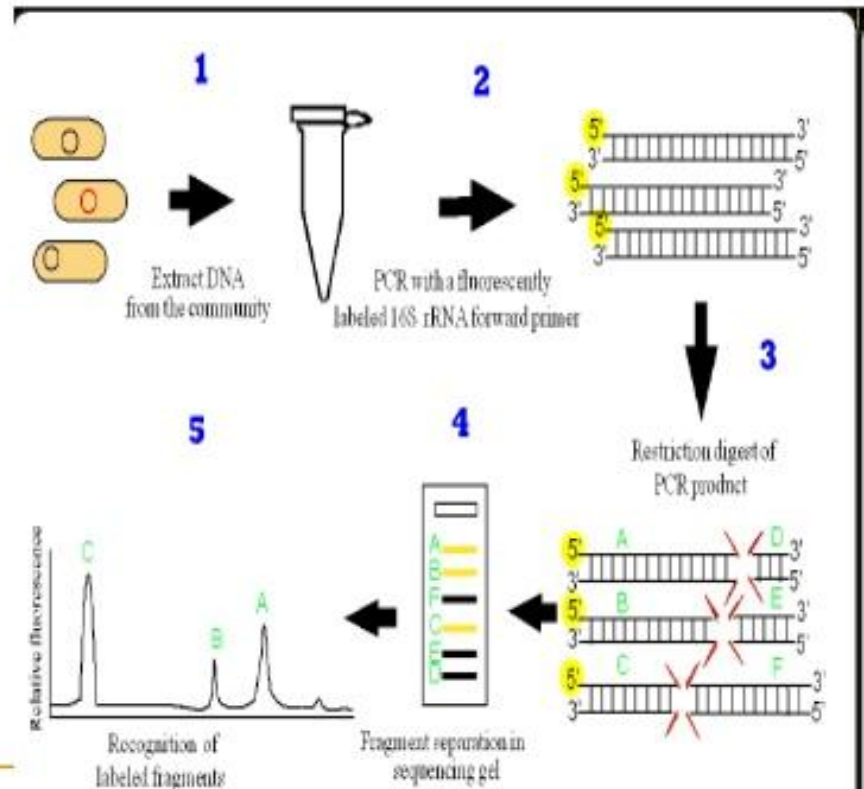
Ces méthodes nécessitent le recueil préalable, par des techniques peu ou non invasives, d'un échantillon biologique (sang total, frottis buccal, racines de cheveux), à partir duquel est **extraît et purifié l'ADN génomique de l'individu et puis amplifier par PCR**

.

Génotypage par RFLP (Polymorphisme des fragments de restriction) :

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

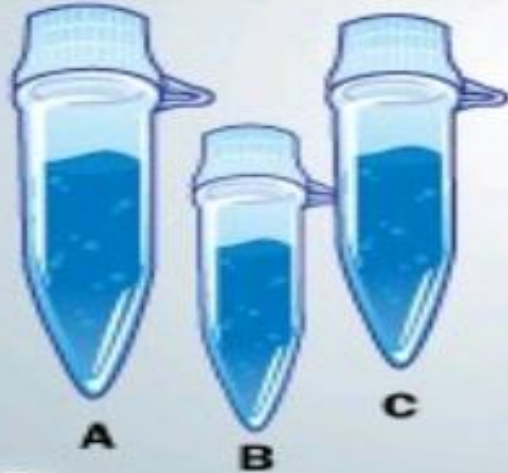
- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) is a technique in which organisms may be differentiated by analysis of patterns derived from cleavage of their DNA.



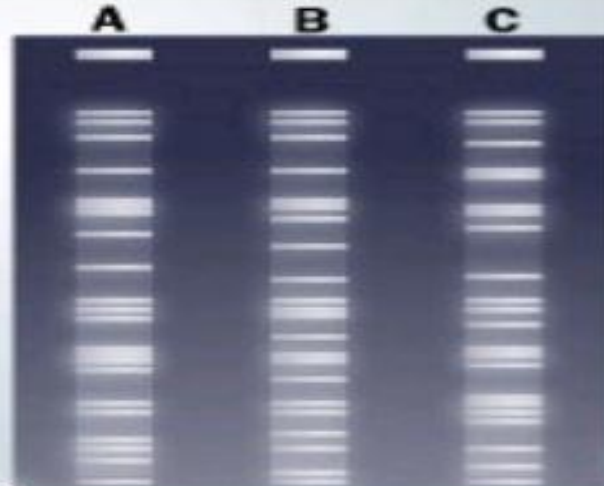
Génotypage par RFLP (Polymorphisme des fragments de restriction) :

How the RFLP Process Works

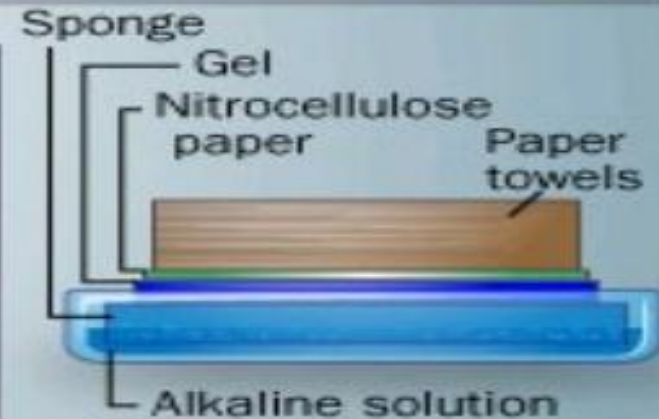
©2008 HowStuffWorks



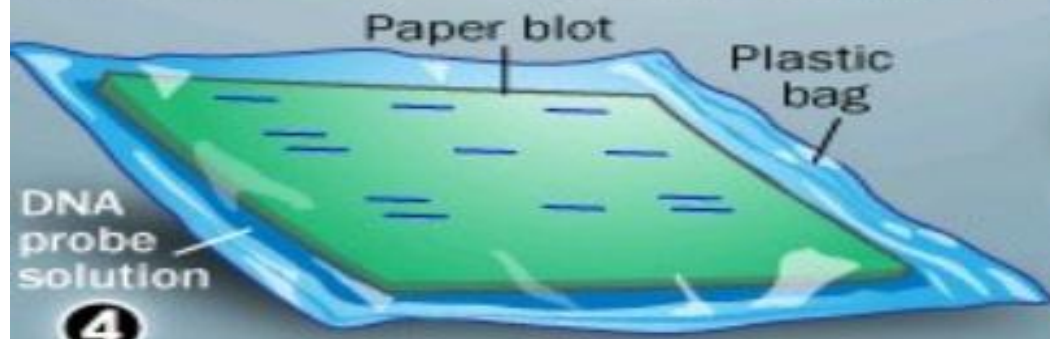
1 DNA Samples with added restriction enzymes produce restriction fragments.



2 Electrophoresis separates the restriction fragments. Each sample forms a characteristic pattern of bands.



3 Alkaline solution is pulled upward through the gel to a sheet of nitrocellulose laid on the top of it, transferring the DNA to the paper.



4 The paper is exposed to a solution containing radioactively-labeled probe.



5 A photographic film laid on top of the paper is exposed by the radioactivity in the bond probe to form an image corresponding to the DNA bands.

Application

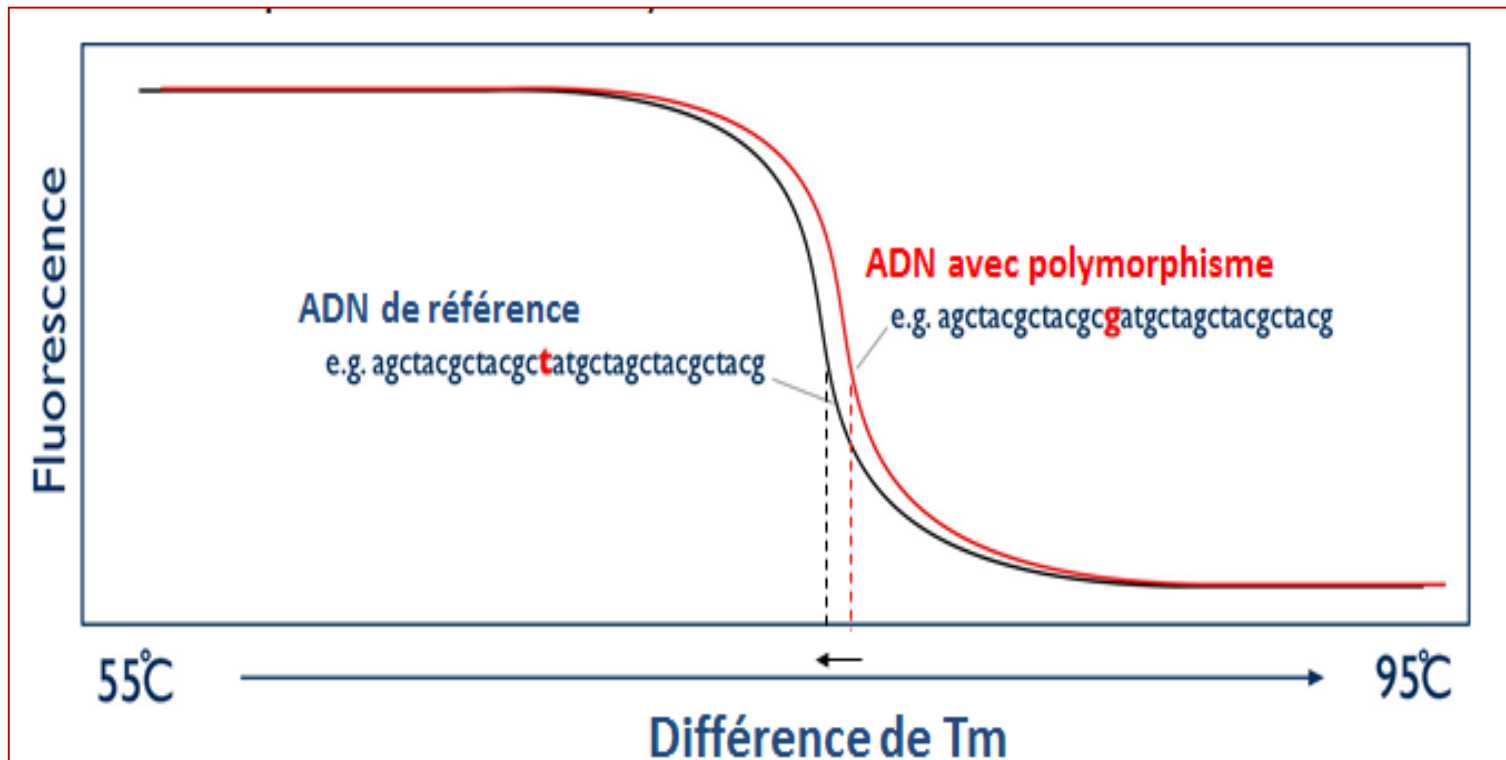
- *Identification de nouvel polymorphisme
- * Génotypage des polymorphismes connus

L'analyse HRM (High Resolution Melting) par PCR

« fusion haute résolution » : analyse de la courbe de désappariement (fusion) d'un échantillon d'ADN amplifié, à haute résolution.

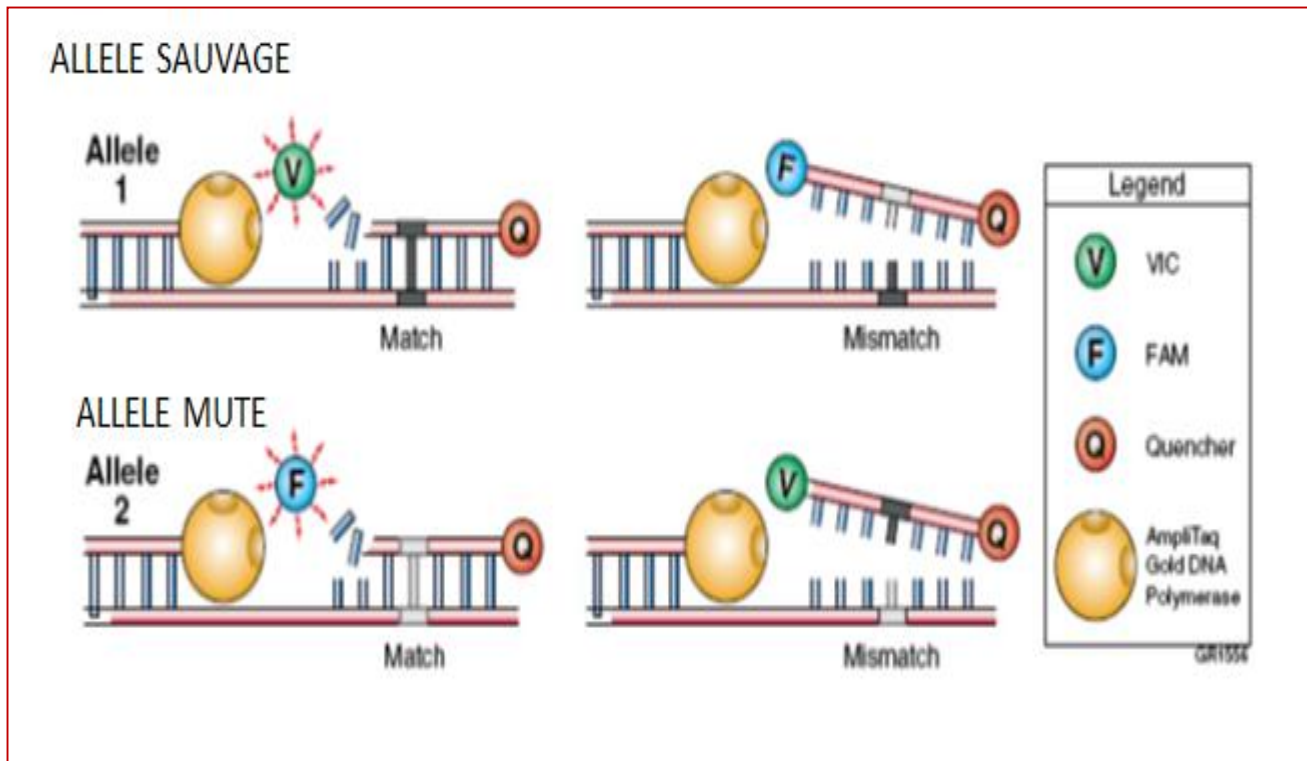
-Applications: recherche de polymorphismes génétiques inconnus y compris les insertions/délétions et mutations combinés)

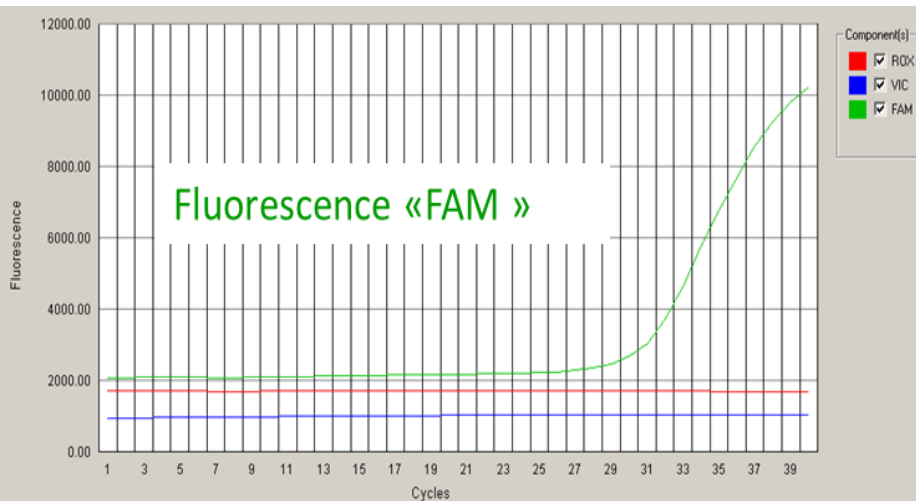
- Analyse des **variations de Tm** (« melting temperature » ou température de fusion)



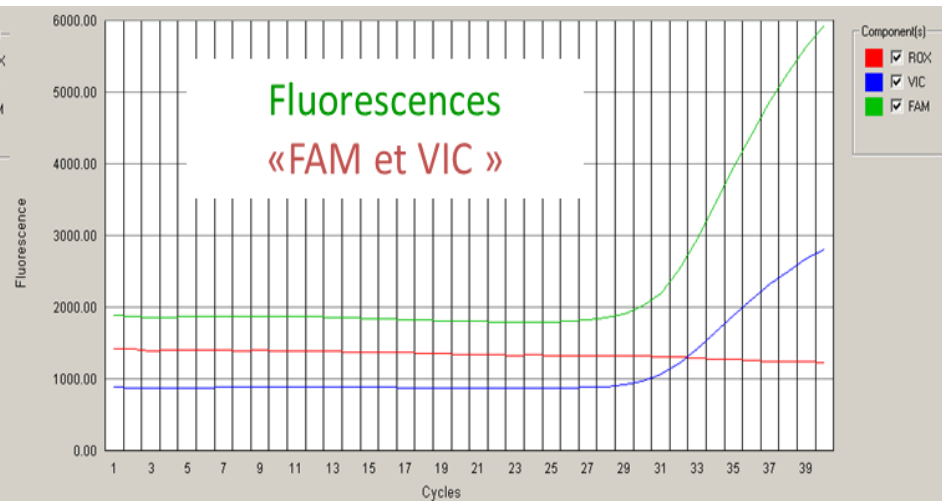
PCR Taqman

Application: génotypage des polymorphismes connus ,
particulièrement comme les SNP et les insertions..

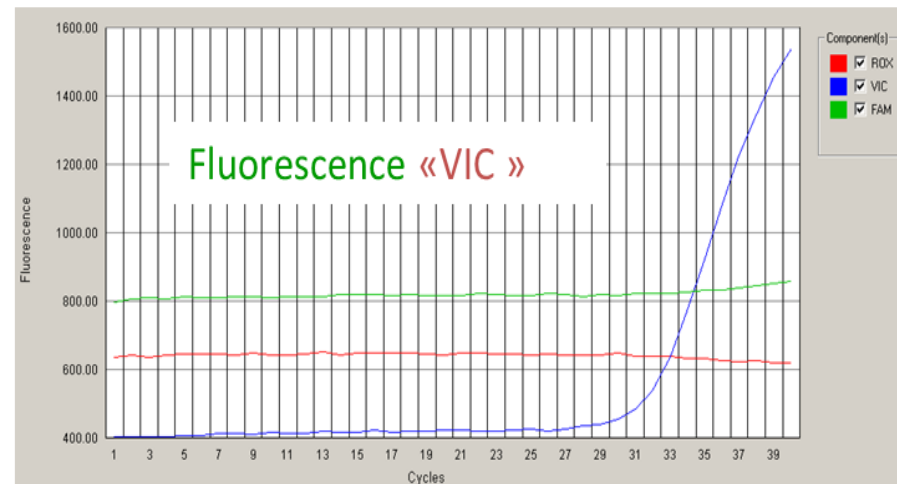




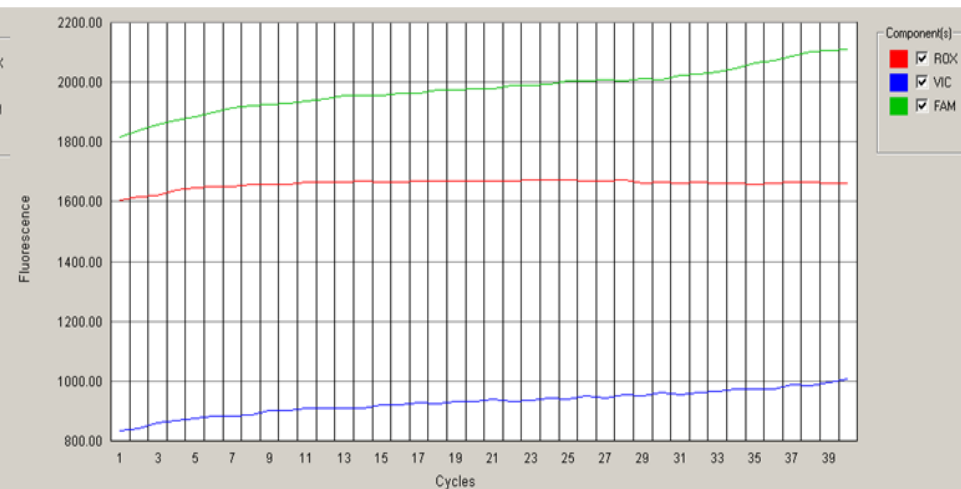
Homozygote sauvage



Hétérozygote

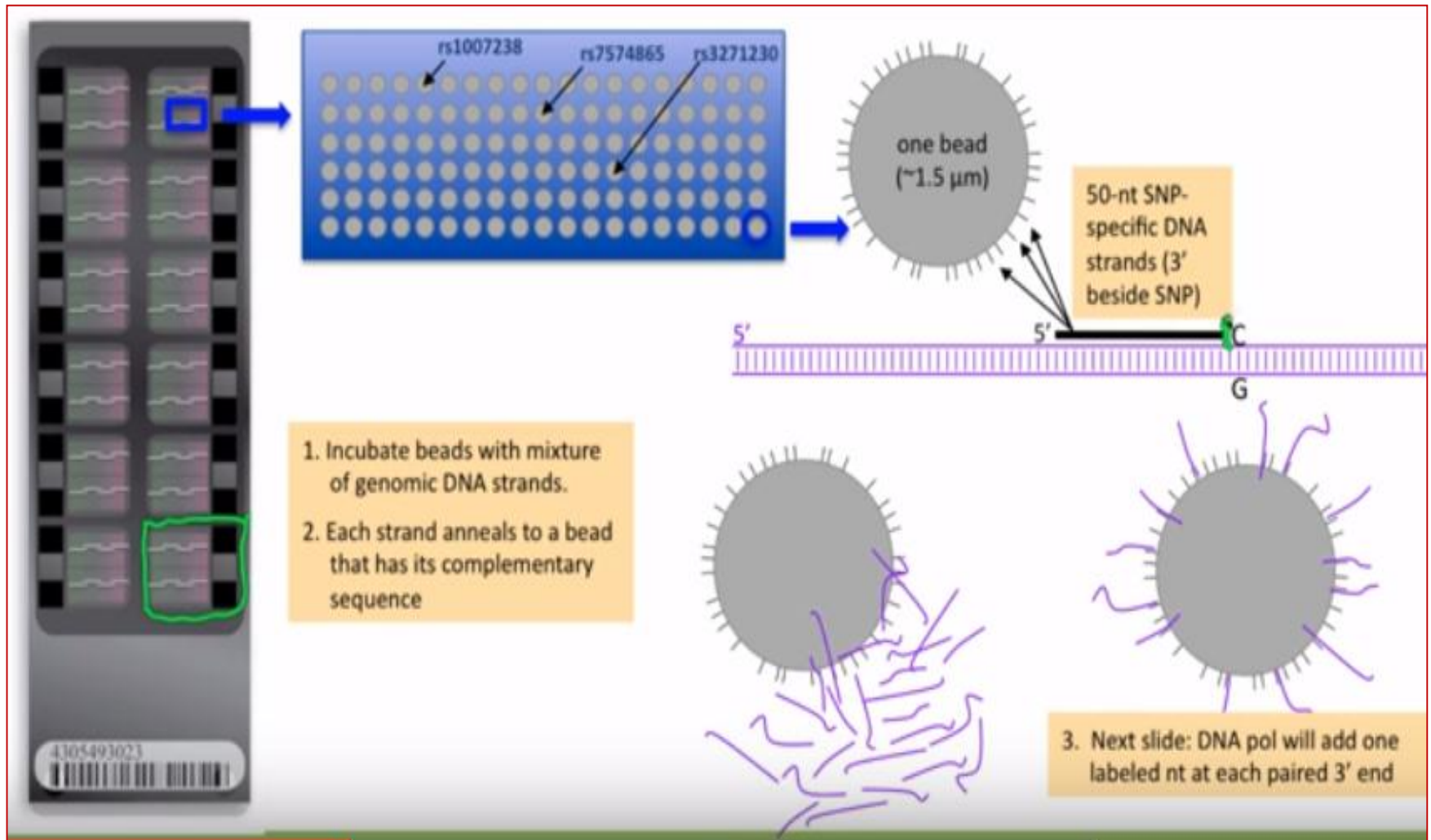


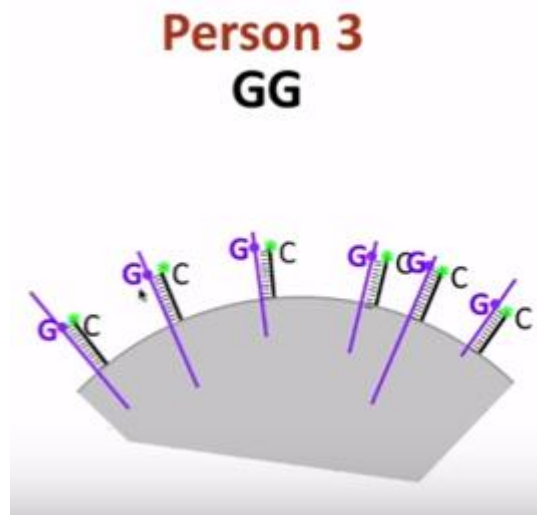
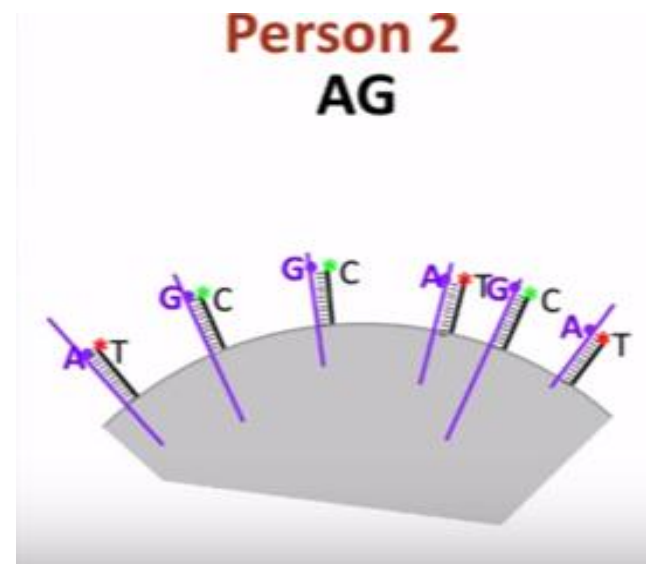
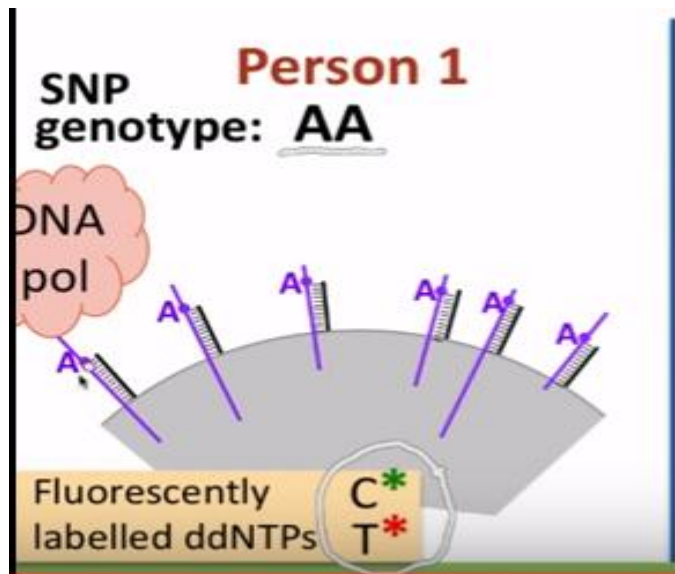
Homozygote muté

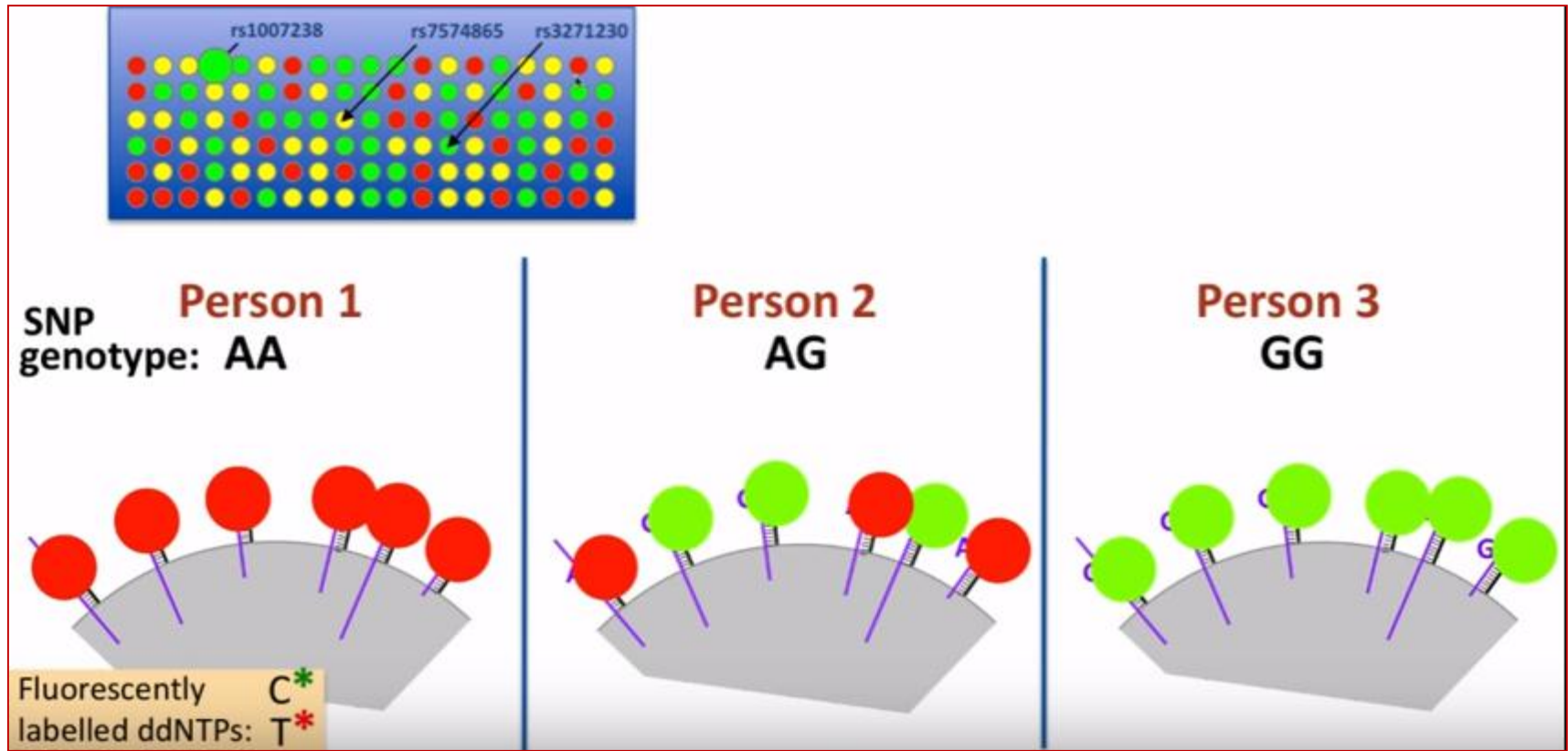


Contrôle négatif

Microarray d'ADN (particulièrement SNP)







- -Scanner la plaque
- -analyse des résultats à l'aide des logicielles de bioinformatique

Application

****Identification de nouveaux polymorphismes (particulièrement les SNP, à large échelle =data en masse)***

****Genotypages des polymorphismes déjà connus***

Application du génotypage en recherche

- *identifier des nouvelles variétés génétiques

- *étudier la fréquences des allèles chez les différentes populations

- *Étudier les conséquences des polymorphismes (attribuer la variabilité génétique au phénotype)

Application du génotypage en cliniques:

- *dépistage des polymorphismes susceptibles d'altérer la réponse pharmacologique à un médicament donné afin d'optimiser le traitement (adapter la dose ou changer le médicament)

- * diagnostique pour expliquer un accident iatrogène ou une absence de réponse à un médicament donné.