

## **Les arylamine N-acétyltransférases : du polymorphisme génétique à la susceptibilité aux xénobiotiques**

**Claudine Deloménie  
Denis M. Grant  
Rajagopal  
Krishnamoorthy  
Jean-Marie Dupret**

La variabilité interindividuelle du métabolisme des xénobiotiques, incluant les médicaments et les polluants présents dans l'environnement, dépend notamment de polymorphismes génétiques influant sur l'activité d'enzymes de biotransformation. Chez l'homme, les arylamine N-acétyltransférases, NAT1 et NAT2, font partie des exemples les mieux documentés d'enzymes de biotransformation polymorphes. Les mécanismes de détoxification et/ou d'activation des xénobiotiques par les NAT mettent en jeu à la fois des processus d'inactivation fonctionnelle par conjugaison et la synthèse d'ions réactifs capables de se lier aux macromolécules cellulaires. Alors que le gène *NAT1* est exprimé dans de nombreux tissus, *NAT2* l'est essentiellement au niveau du foie et de l'intestin, et constitue le locus polymorphe le plus étudié. Le polymorphisme de *NAT2* se traduit par l'expression de variants enzymatiques dont les propriétés fonctionnelles engendrent l'existence des phénotypes « acétyleur lent » et « acétyleur rapide ». Le phénotype « acétyleur lent » a souvent été associé à un risque accru de réactions indésirables aux médicaments.

### ADRESSES

C. Deloménie: *assistant ingénieur à l'Inserm*. R. Krishnamoorthy: *directeur de recherche à l'Inserm*. J.M. Dupret: *maître de conférences à l'université Denis-Diderot, Paris 7, UFR de biochimie*. Inserm U. 458, Hôpital Robert-Debré, 48, boulevard Sérurier, bâtiment Écran 4, 75019 Paris, France. D.M. Grant: *associate professor*. Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Research Institute, Hospital for Sick Children, 555 University Avenue, Toronto, M5G 1X8 Canada.

**C**hez certains individus, l'administration d'un anti-paludéen, la primaquine, déclenche une série de troubles hémolytiques pouvant s'avérer fatals. La démonstration, faite dans les années 1950, de l'existence d'un lien entre ces effets et l'absence héréditaire de glucose-6-phosphate déshydrogénase, a fondé

les bases d'une nouvelle discipline située à l'interface de la pharmacologie et de la génétique: la pharmacogénétique. Celle-ci étudie les mécanismes d'origine génétique intervenant dans la variabilité interindividuelle des réponses aux médicaments et, plus généralement, aux xénobiotiques [1, 2]. La pharmacogénétique s'intéresse également aux conséquences de ces

variations, en particulier en thérapeutique, en tératologie et en cancérologie. L'étude de l'activité arylamine N-acétyltransférase (NAT)\* constitue chez l'homme l'un des modèles de pharmacogénétique les plus avancés. Elle ouvre de nombreuses perspectives dans la compréhension des mécanismes moléculaires à la base des toxicités causées par certains agents chimiques, thérapeutiques ou non.

### Polymorphisme d'acétylation et réactions indésirables aux médicaments

Les variations génétiques affectant la pharmacocinétique des xénobiotiques comprennent non seulement des défauts génétiques rares, mais aussi ceux pouvant être associés à un trait polymorphe. Un polymorphisme pharmacogénétique implique l'existence, pour le gène considéré, d'au moins deux allèles, dont le plus rare est présent à une fréquence d'au moins 1% au sein d'une population, et cause une variabilité dans la réponse à un ou plusieurs xénobiotiques.

Le polymorphisme « classique » d'acétylation fut découvert en même temps que la grande efficacité de l'isoniazide (INH) dans le traitement de la tuberculose [3]. On observa initialement que, si de nombreux patients excrétaient rapidement une dose d'INH sous forme de dérivés conjugués inactifs, d'autres conservaient plus longtemps une concentration plasmatique élevée d'INH non transformé, en relation avec l'élimination moins efficace du médicament. Des données quantitatives ont vite montré que les populations étudiées se divisaient en deux groupes d'individus, les uns dits métaboliseurs « rapides », les autres, métaboliseurs « lents » de l'INH. Des études familiales ont ensuite permis d'établir l'origine génétique de ce défaut métabolique, sous la forme d'un caractère à transmission autosomique récessive. Enfin, des investigations

biochimiques ont révélé que cette moindre vitesse d'élimination provenait d'une réduction de la vitesse de N-acétylation du médicament dans le foie. Ce n'est que trente ans plus tard qu'une enzyme cytosolique essentiellement hépatique, de type arylamine N-acétyltransférase (NAT2), fut reconnue comme directement responsable de ce polymorphisme – dit « classique » – d'acétylation [4].

Le spectre réactionnel de NAT2 s'étend à un grand nombre de substances de type arylamine et hydrazine. L'activité de conjugaison de l'enzyme entre en jeu au cours de la phase II du métabolisme des xénobiotiques (figure 1). Ce type de biotransformation s'exerce fréquemment sur des métabolites oxydés produits par les enzymes de phase I,

qui sont, pour l'essentiel, des mono-oxygénases à cytochrome P-450 [5, 6]. La combinaison des phases I et II permet la détoxication et l'élimination de nombreux xénobiotiques. Cependant, comme on le verra plus loin, certains produits de ce métabolisme, très réactifs, peuvent être impliqués dans des phénomènes de toxicité médicamenteuse ou de cancérisation.

Plusieurs types de réactions adverses idiosyncrasiques consécutives à la prise d'un médicament ont été associés au polymorphisme classique d'acétylation [3] (Tableau IA). Ces réactions concernent le plus souvent les individus « acétyleurs lents », susceptibles de présenter une déficience dans l'inactivation de molécules potentiellement toxiques. Ainsi la

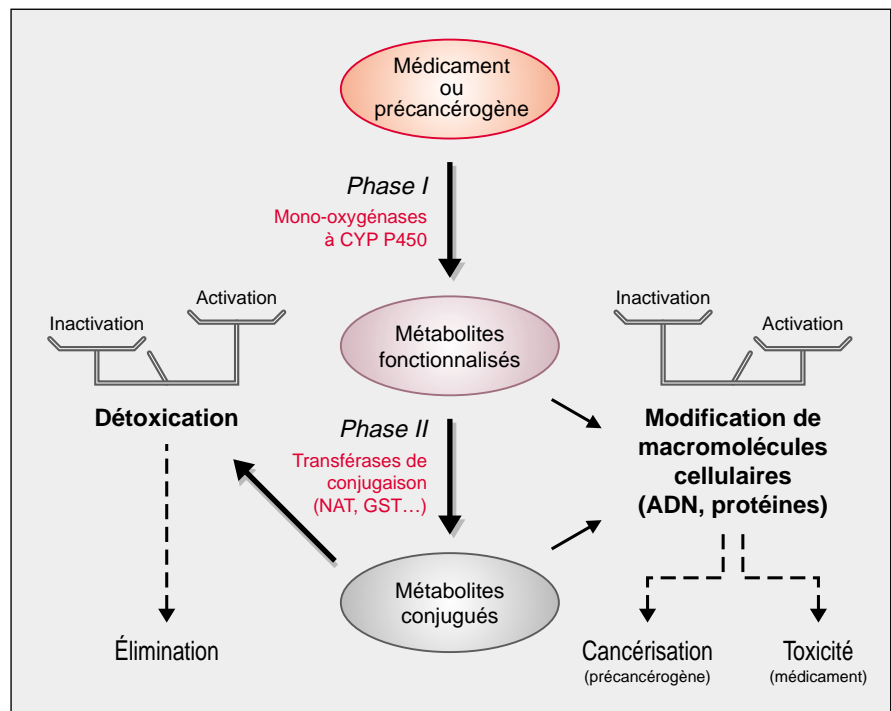


Figure 1. **Voies principales de détoxication et d'activation des xénobiotiques.** Le métabolisme des xénobiotiques est traditionnellement divisé en deux phases. La première (phase I) correspond à des réactions de fonctionnalisation essentiellement catalysées par des mono-oxygénases à cytochrome P450. À cette première étape succède une phase II correspondant le plus souvent à des réactions de conjugaison. Les enzymes contrôlant la phase II sont pour l'essentiel des transférases dont les arylamine N-acétyltransférases NAT1 et NAT2. Les phases I et II aboutissent en général à la formation de métabolites inactifs facilement éliminés par l'organisme. Cependant, certains métabolites formés à partir de ces phases réactionnelles peuvent s'avérer plus toxiques que le xénobiotique d'origine. L'activation supplante alors l'inactivation et des altérations cellulaires, en général restreintes à certains tissus, peuvent être engendrées. Certaines de ces altérations peuvent conduire à augmenter la probabilité de cancérisation, d'autres à engendrer des phénomènes toxiques, dont des réactions d'hypersensibilité.

\* Il existe d'autres types d'acétyltransférases, dont les substrats sont aussi variés que le chloramphénicol, la spermine, les histones, et l'extrémité N-terminale de nombreuses protéines. Ces enzymes n'ont pas de similitude de séquence avec les arylamine NAT.

Tableau I

ASSOCIATIONS DÉMONTRÉES ENTRE CAPACITÉS MÉTABOLIQUES D'ACÉTYLATION DE TYPE NAT2 ET RÉACTIONS INDÉSIRABLES AUX MÉDICAMENTS (A) OU AFFECTIONS NON MÉDICAMENTEUSES (B) (d'après [3, 7, 33-40])

**A. Réactions indésirables aux médicaments**

Médicament	Acétyleurs lents	Acétyleurs rapides	Références
<i>Isoniazide</i>	neuropathies périphériques	posologie suboptimale	[3]
<i>Sulfamides</i>	hypersensibilité		[7]
<i>Hydralazine</i>	lupus érythémateux disséminé	posologie suboptimale	[3]
<i>Procainamide</i>	lupus érythémateux disséminé		[3]
<i>Sulfazine</i>	nausées, vomissements,		[3]
et <i>Sulfapyridine</i>	vertiges, anémie hémolytique		
<i>Amonafide</i>		leucopénie	[33]

**B. Affections non médicamenteuses**

Acétyleurs lents	Références	Acétyleurs rapides	Références
cancers vessie	[34]	cancers colo-rectal ?	[39]
foie	[35]	poumon ?	[40]
mésothéliome	[36]		
sein ?	[37]		
syndrome de Gilbert	[3]		
hyperthyroïdie	[3]		
maladie périodique	[3]		
allergies	[38]		
lèpre	[3]		

Plusieurs associations significatives ont été établies entre l'appartenance à un type acétyleur (déterminé d'après le génotype et/ou le phénotype NAT2) et le risque de survenue d'une maladie ou d'une insuffisance thérapeutique. Certaines associations, notées (?), font l'objet de controverses, d'autres, comme les susceptibilités envers la maladie de Gilbert, l'hyperthyroïdie ou la lèpre sont a priori très surprenantes et doivent être étayées. D'autres facteurs de risque peuvent se surajouter, et notamment le tabagisme (cancers du poumon, du sein, du côlon, de la vessie), l'origine ethnique (lèpre), l'alimentation (cancer colo-rectal), ou bien encore l'exposition à l'amiante (mésothéliome).

prise régulière d'INH induit-elle plus fréquemment des neuropathies périphériques chez ces individus. De même, la survenue de lupus érythémateux disséminé est plus fréquente, chez les acétyleurs lents, lors de l'administration chronique de l'antiarythmique cardiaque procainamide ou de l'antihypertenseur hydralazine, tous deux substrats de l'enzyme NAT2. Par ailleurs, le phénotype « lent » de N-acétylation a été corrélé à une prévalence accrue de réactions d'hypersensibilité vis-à-vis de certains médicaments, et en particulier des sulfamides [7]. Chez les acétyleurs rapides, les problèmes rencontrés sont plutôt du domaine de l'insuffisance thérapeutique, la dose médicamenteuse correspondant à la

posologie « standard » étant trop rapidement éliminée. De telles difficultés ont été rapportées notamment dans le cadre de traitements par l'INH [3].

### Les isoenzymes NAT1 et NAT2

L'existence d'une seconde arylamine N-acétyltransférase, aujourd'hui appelée NAT1, a été démontrée chez l'homme [8] et chez d'autres mammifères. Malgré le fort degré d'identité (80 %) de leurs séquences d'acides aminés, les enzymes NAT1 et NAT2 humaines diffèrent remarquablement dans leur stabilité fonctionnelle et leurs paramètres cinétiques. Parmi les substrats préférentiels de ces isoenzymes, les plus communé-

ment testés, à titre pronostique ou expérimental, sont l'INH et la sulfaméthazine (de « type NAT2 »), et les acides *para*-amino-salicylique et *para*-amino-benzoïque (de « type NAT1 ») [8]. Si NAT2 paraît surtout active au niveau du foie et de l'intestin, l'expression de NAT1 semble beaucoup plus largement distribuée. L'activité NAT1 a en effet été décrite à partir de plusieurs tissus et lignées cellulaires, provenant du foie, des muqueuses du côlon [9] et de la vessie [10], mais aussi des leucocytes mononucléaires, des érythrocytes [11], du placenta [12] et de la glande mammaire [13]. Enfin, bien que polymorphe elle aussi, NAT1 semble totalement indépendante des variations d'activité NAT liées au polymorphisme classique d'acétylation déterminé par NAT2. Des deux isoenzymes, NAT2 fut historiquement identifiée la première du fait essentiellement de la large prescription des substrats médicamenteux qui l'ont révélée (Tableau IA). Quant au phénotype d'acétylation associé à NAT1, aucune substance médicamenteuse courante ne permet actuellement d'en effectuer la mesure *in vivo*. L'acide *para*-amino-salicylique n'est plus en effet disponible sous forme médicamenteuse et les mesures d'activité enzymatique doivent être effectuées *in vitro* à partir des leucocytes.

Les gènes NAT1 et NAT2 humains sont localisés au niveau de la région 8p21.3-23.1 du chromosome 8 et seraient distants l'un de l'autre de quelques centaines de kilobases [14]. Bien qu'aucun élément ne permette de définir avec certitude l'origine phylogénétique de ces gènes, il est intéressant de constater l'existence, chez différents vertébrés (oiseaux, mammifères), de protéines NAT aux séquences primaires très semblables entre elles. De plus, chacune de ces espèces possède deux, voire trois NAT fonctionnelles [15]. Ces caractéristiques suggèrent que la duplication d'un gène ancestral aurait engendré au moins deux gènes dont l'un (NAT2 dans l'espèce humaine) pourrait avoir acquis un profil d'expression restreint à certains tissus (foie, intestin) et à certains stades du développement (période postnatale). Le gène NAT1 aurait, en revanche, conservé

une expression beaucoup plus ubiquitaire et débutant plus précocement (dès la vie fœtale) [16]. Sans ce processus conférant à NAT1 et NAT2 un certain degré de « spécialisation », on peut imaginer que les gènes NAT surnuméraires, issus de duplications ancestrales, n'auraient engendré que des pseudogènes, tels que NATP1 identifié chez l'homme. L'acquisition de données fonctionnelles supplémentaires, chez d'autres vertébrés et à partir de groupes zoologiques plus diversifiés, est cependant nécessaire pour étayer cette hypothèse.

Afin d'étudier les relations structure-fonction des enzymes NAT1 et NAT2, la région codante des gènes humains a été exprimée chez *Escherichia coli*. Ce système d'expression a permis de produire des protéines aux caractéristiques immunologiques et enzymatiques voisines de celles des enzymes extraites de tissus. La mutagenèse dirigée a ensuite permis d'identifier la cystéine en position 68 de la séquence primaire, comme porteuse du groupement sulfhydryle actif de NAT2 [17] et de NAT1 [18]. Deux autres acides aminés importants sur le plan fonctionnel ont pu être identifiés par la même approche : les arginines situées en positions 9 et 64, seuls résidus basiques intégralement conservés parmi toutes les NAT connues. Ensemble, elles participeraient au maintien de la conformation active des NAT et, dans le cas de NAT1, aux interactions enzyme-substrat [18] (figure 2).

Par ailleurs, un segment d'une quarantaine d'acides aminés, situé entre les positions 211 et 250 des séquences primaires, pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de la stabilité des deux isoformes [19]. Au total, les techniques de mutagenèse dirigée et d'expression hétérologue couplées à certaines approches physico-chimiques, ont déjà rendu possible une première exploration des domaines fonctionnels des protéines NAT. Cependant, la compréhension fine de leurs mécanismes catalytiques nécessite, à terme, que soient proposés des modèles de structure tridimensionnelle, auxquels pourront alors être confrontées les données fonctionnelles obtenues antérieurement.

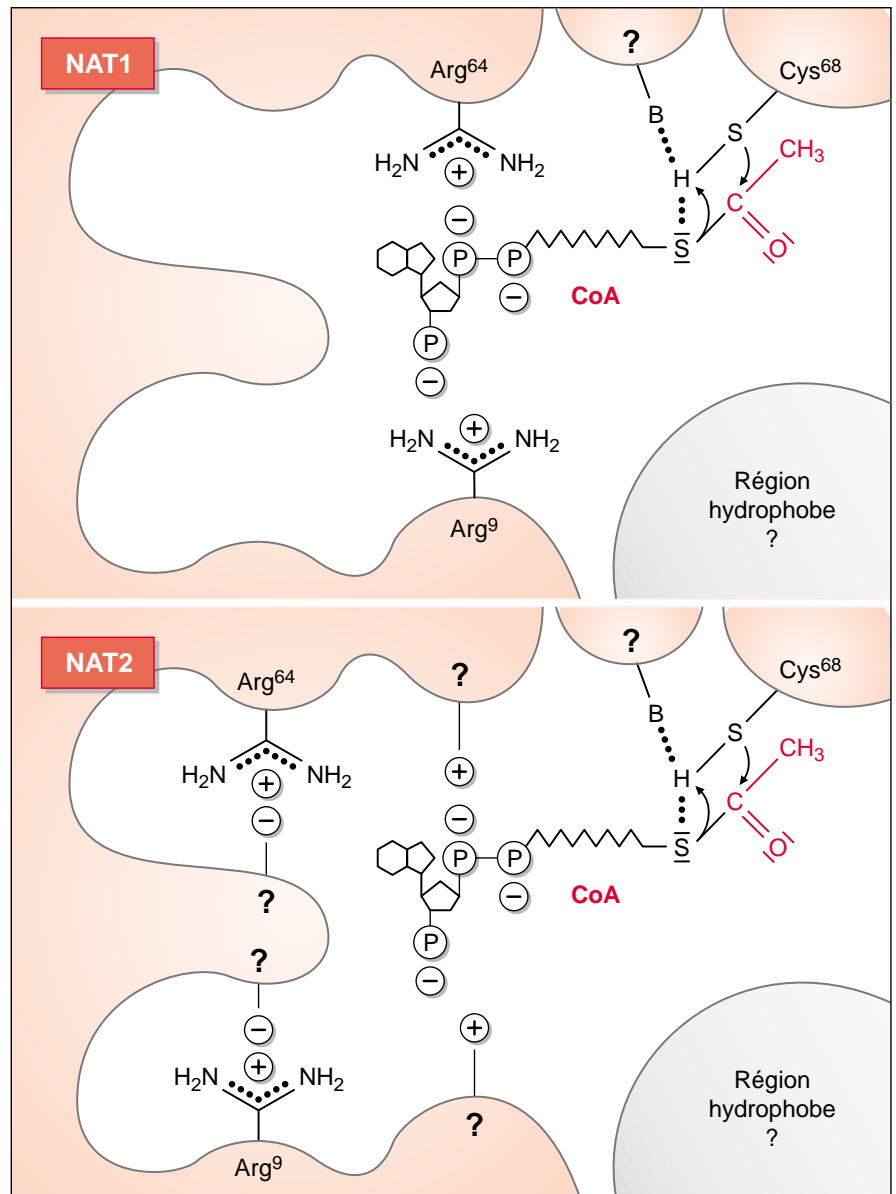


Figure 2. **Hypothèses de mécanismes catalytiques pour les N-acétyltransférases (d'après [17, 18]).** L'alignement des séquences primaires de NAT connues chez six vertébrés (homme, lapin, rat, souris, hamster, poulet) et chez *Salmonella typhimurium* fait apparaître trois acides aminés intégralement conservés (une cystéine et deux arginines). Le thiol du résidu actif Cys<sup>68</sup> lierait transitoirement l'acétyl provenant de l'acétyl co-enzyme A. Cette liaison serait favorisée par un groupe basique (B), capteur transitoire de proton selon un mécanisme de catalyse basique générale. Quant aux résidus Arg<sup>9</sup> et Arg<sup>64</sup>, ils stabiliseraient ensemble la conformation active des NAT. Dans le cas de NAT1, leurs charges positives pourraient interagir directement avec les phosphates de l'acétyl co-enzyme A chargés négativement, stabilisant ainsi l'état de transition. Concernant NAT2, l'effet stabilisateur proviendrait d'interactions entre ces arginines et d'autres acides aminés proches dans la structure tridimensionnelle de la protéine. Dans les deux cas, l'existence d'une région hydrophobe intervenant dans les interactions de l'enzyme avec le substrat accepteur arylamine peut être envisagée à proximité du site actif.

## Bases génétiques de la variabilité des NAT

Le phénotype lent lié au polymorphisme NAT2 est déterminé le plus souvent aujourd'hui par un test non invasif à la caféine [20]. Celui-ci repose sur la quantification par chromatographie liquide à haute pression de métabolites urinaires de la caféine ingérée sous forme purifiée ou alimentaire. Le rapport des concentrations molaires de ces métabolites, le 5-acétyl-6-formylamino-3-méthyluracile (AFMU) et le 1-méthylxanthine (IX), constitue l'indice d'acétylation le plus couramment utilisé. Au niveau moléculaire, le phénotype lent se caractérise par la présence dans le foie d'une quantité réduite de protéine NAT2 immunoréactive, corrélée à une faible activité enzymatique [4]. Ces acétylateurs lents possèdent une paire de variants alléliques présentant chacun, au niveau de la région codante du gène NAT2, une substitution ponctuelle déterminant une variation majeure d'acide aminé (figure 3A). La plupart de ces variants, dont près d'une vingtaine ont été caractérisés [15], coderaient pour des enzymes instables et/ou correspondraient à des ARNm présentant une moindre capacité de traduction. La distribution des variants alléliques NAT2\* au sein des populations diffère largement selon l'origine ethnique de celles-ci (figure 4). Comparées aux autres, les populations africaines natives (autochtones) semblent posséder un plus fort degré de variabilité au locus NAT2, ce qui a permis de suggérer que ce polymorphisme serait apparu, au cours de la phylogénèse de l'homme moderne, avant que les populations non africaines ne se séparent du groupe africain ancestral [21]. Jusqu'à présent, l'étude des distributions de ces différents allèles NAT2\* a permis de rendre compte pour l'essentiel des variations interethniques observées sur le plan phénotypique. L'enzyme NAT1, initialement considérée comme « monomorphe », présente, elle aussi, une variabilité d'origine génétique identifiée tardivement. Cinq variants alléliques ont été décrits, et l'une des variations de séquence impliquées, concernant le signal de polyadénylation, pourrait agir sur la stabilité de l'ARNm [15]

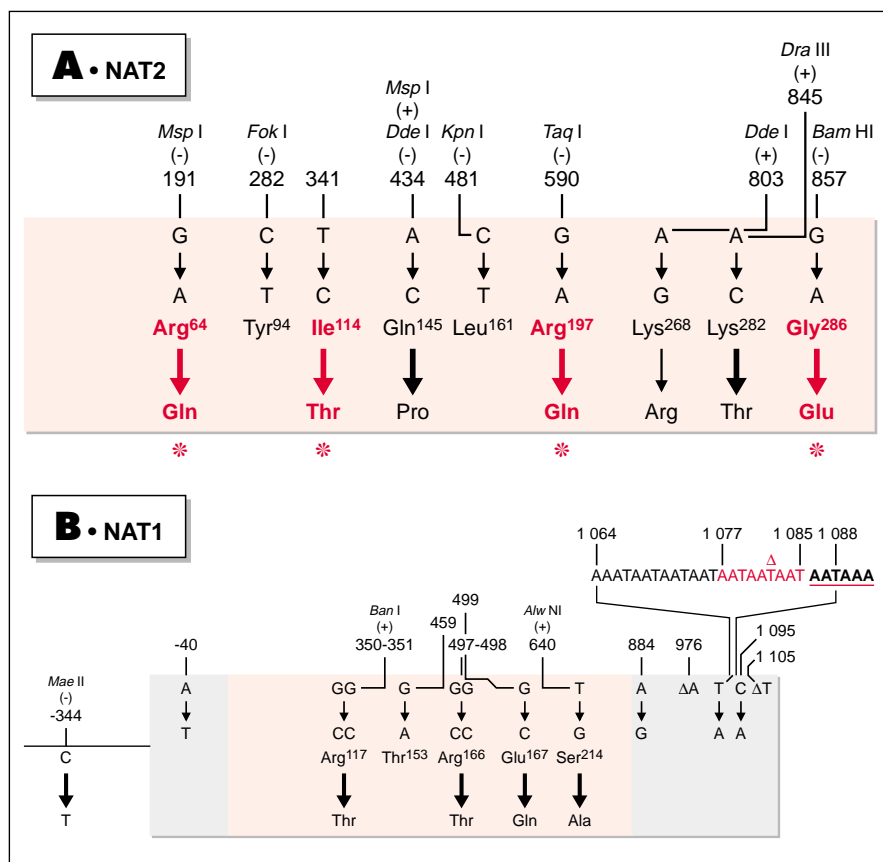


Figure 3. **Polymorphismes génétiques des N-acétyltransférases humaines.** Les polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP) associés sont mentionnés: (+), coupure; (-), absence de coupure. Au sein de la séquence codante NAT2 (A), neuf variations nucléotidiques ponctuelles ont été identifiées, dont six déterminent une substitution d'acide aminé importante sur le plan fonctionnel (flèches épaisses). Quatre de ces dernières (\*), majeures par leur fréquence dans les populations humaines, définissent les quatre grandes classes de variants alléliques NAT2\* associés au phénotype acétylateur lent (au sens « classique » du terme). Elles peuvent être associées ou non à d'autres variations, « silencieuses » (C<sup>282</sup> → T et C<sup>481</sup> → T) ou peu modificatrices sur le plan fonctionnel (Lys<sup>268</sup> → Arg). Chacune de ces quatre variations majeures s'exprime selon un mode récessif. Cette récessivité n'est cependant pas complète puisque certaines techniques de phénotypage permettent de distinguer l'activité des homozygotes non variants de celle des hétérozygotes porteurs d'un allèle variant. Dans le cas de NAT1 (B), quatorze sites polymorphes ont été identifiés au niveau des régions codante (cadre rose), 5' et 3' non traduites (cadres gris), et 5'-flanquante (ligne). En particulier, la transversion T<sup>1088</sup> → A située dans une séquence consensus qui correspondrait à un signal de polyadénylation (AATAAAA), pourrait stabiliser l'ARN messager correspondant. Une délétion (Δ) de neuf nucléotides (en rouge) est également rencontrée à proximité de ce motif. En plus des cinq allèles NAT1 humains associés au phénotype acétylateur lent déjà répertoriés en 1995, d'autres ont été identifiés plus récemment [résultats non publiés], dont un variant tronqué et un allèle produisant une substitution de l'Arg<sup>64</sup>. Cependant, on dispose encore de peu de données concernant l'activité des variants NAT1. De façon générale, il n'est pas exclu que les variants enzymatiques NAT puissent différer entre eux par leur sélectivité réactionnelle vis-à-vis de certains substrats non encore identifiés.

Groupes ethniques (n)	Allèles "acétyleurs rapides"	Allèles "acétyleurs lents"			
		G191A Arg <sup>64</sup> ↓ Gln	T341C Ile <sup>114</sup> ↓ Thr	G590A Arg <sup>197</sup> ↓ Gln	G857A Gly <sup>286</sup> ↓ Glu
	<35 %		>29 %		<5 %
Caucasiens-Américains (421)	0,240	0	0,430	0,310	0,020
Caucasiens-Européens (434)	0,263	0	0,455	0,264	0,018
Indiens (61)	0,257	0	0,330	0,380	0,033
Africains-Américains (214)	0,347	0,083	0,295	0,230	0,045
Africains natifs	0,270	0,086	0,404	0,221	0,019
Gabonais (52)					
Dogon (50)	0,250	0,050	0,300	0,370	0,030
Hispano-Américains (148)	0,403	0,007	0,275	0,180	0,135
Amérindiens	0,740	0	0,021	0	0,239
Ngawbé (71)					
Emberà (101)	0,653	0	0,104	0,035	0,208
Coréens (85)	0,681	0,011	0,018	0,180	0,110
Japonais (224)	0,671	0	0,014	0,220	0,095
Chinois (254)	0,532	0	0,051	0,296	0,121
Philippins (100)	0,395	0	0,065	0,360	0,180
Polynésiens (25)	0,600	0	0,040	0,340	0,020
Inuits (90)	0,789	0	0,016	0,156	0,010
	>50 %		<7 %		>9 %

Figure 4. **Comparaison interethnique des distributions d'allèles NAT2\***. (d'après [21]). La fréquence des allèles « lents » appartenant aux quatre classes majeures (voir figure 3A) et des allèles non variants (« rapides »), a été déterminée chez plus de 2300 sujets d'origines ethniques très diversifiées. Si l'on considère les fréquences de variants NAT2 Ile<sup>114</sup> → Thr et Gly<sup>286</sup> → Glu, et les fréquences de non variants, deux ensembles relativement homogènes se distinguent parmi les treize populations représentées. Les Asiatiques (au sens large du terme), pauvres en allèles NAT2\* « lents », se différencient en effet nettement d'un groupe réunissant Caucasiens, Indiens et Africains. Les Hispano-Américains et les Amérindiens présentent un profil intermédiaire, et la parenté phylogénétique, démontrée par ailleurs, entre Amérindiens et Asiatiques se retrouve également ici. Quant aux populations originaires d'Afrique subsaharienne, elles présentent les taux les plus élevés de variants NAT2 substitués en Arg<sup>64</sup> → Gln.

(figure 3B). Ce polymorphisme encore mal connu ne se superpose pas au polymorphisme « classique » d'acétylation, puisque son expression phénotypique paraît totalement indépendante de ce dernier [22].

La connaissance de la variabilité génétique aux locus NAT1 et NAT2 pourrait être un élément important pour la compréhension et la prévision de certaines réactions adverses aux médicaments liées à l'activité des enzymes NAT. A titre d'exemple, certaines études ont permis de faire progresser l'étiologie des hypersensibilités induites par les sulfamides chez des patients atteints ou non de SIDA.

Des mesures de phénotype NAT2 chez les caucasiens ont d'abord permis de montrer qu'environ 90 % des individus hypersensibles sont acétyleurs lents [7]. Cette proportion significativement plus élevée que celle rencontrée dans la population générale correspondante (environ 50 %) suggérerait que le génotype NAT2\* de type lent pouvait être un facteur de risque pour l'hypersensibilité aux sulfamides. Cette hypothèse a pu être corroborée par l'étude de patients ayant développé une nécrose épidermique toxique (syndrome de Lyell) après la prise de sulfamides : 94 % d'entre eux présentaient

en effet un génotype NAT2\* de type lent [23]. Naturellement, la proportion élevée des génotypes associés au phénotype acétyleur lent chez les caucasiens implique que cette hyper-réactivité mette en jeu d'autres déterminants non encore caractérisés. Par ailleurs, la constatation selon laquelle les caucasiens atteints de SIDA développent une intolérance aux sulfamides pour près de 50 % d'entre eux, a conduit à envisager que ces derniers posséderaient préférentiellement un phénotype acétyleur lent génétiquement déterminé au locus NAT2. Pour tester cette hypothèse, l'analyse phénotypique directe était cependant peu adaptée, en raison notamment de la possibilité d'interactions médicamenteuses. L'approche génétique a donc été choisie, et a permis de montrer que les deux groupes de patients, intolérants et tolérants aux sulfamides, ne se distinguaient pas par la nature de leurs génotypes NAT2\*. La toxicité des sulfamides pourrait donc être ici la conséquence plus ou moins directe de perturbations métaboliques liées au SIDA. Le génotype NAT2\* lent ne peut alors être considéré comme un facteur de risque chez ces patients [24], même si l'implication d'autres enzymes de biotransformation n'est cependant pas à exclure.

### Toxicités non médicamenteuses dépendantes des NAT

Parmi les voies métaboliques pouvant conduire à la formation d'adduits covalents de l'ADN, figure la biosynthèse d'ions arylazonium, très électrophiles. La liaison de ces derniers à l'ADN est considérée comme une source potentielle de mutations et par là même accroîtrait la probabilité de cancérisation. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que les N-acétyltransférases sont capables de participer à la formation de ces ions [25]. Les pré-curseurs ainsi activés sont des amines cycliques et hétérocycliques provenant de sources environnementales telles que la fumée de cigarette, certains résidus de cuisson des aliments, ou encore des polluants industriels. Les principales voies métaboliques conduisant à la formation de ces molécules réactives mettent en jeu, d'une part, des réactions de N-oxyda-

tion catalysées par les mono-oxygénases à cytochrome P-450 (en particulier les isoformes CYP1A1 et CYP1A2), et d'autre part, des réactions de *N*- et *O*-acétylation et de *N,O*-transacétylation, potentiellement catalysées par NAT1 et/ou NAT2. La combinaison de ces activités enzymatiques peut induire l'apparition de composés acétoxyarylamine instables, à l'origine des ions arylazonium (figure 5). D'autres activités enzymatiques pourraient également intervenir, en particulier de type cyclo-oxygénase, glucuronyltransférase et sulfotransférase.

Au total, par la production de dérivés acétylés, les enzymes NAT1 et NAT2 doivent être considérées comme participant globalement à la détoxification de certains xénobiotiques, mais leur potentiel activateur peut aussi constituer, au moins localement au sein de certains tissus, une source d'apparition de métabolites toxiques. Ceux-ci sont en particulier capables de se fixer à des macromolécules (acides nucléiques, protéines) et d'altérer ainsi certaines fonctions cellulaires (figure 1).

Les données épidémiologiques reliant les variations d'activité NAT et les risques de cancérisation (Tableau IB) suggèrent une influence des mécanismes activateurs qui viennent d'être cités [26]. L'existence d'associations statistiques liant l'apparition de certains cancers au phénotype acétyleur rapide et d'autres cancers au phénotype lent peut surprendre; cette contradiction n'est qu'apparente. Schématiquement, en effet, une forte acétylation peut engendrer un excès de molécules cytotoxiques (figure 5); au contraire, une faible activité produit certes moins de molécules réactives, mais les processus de détoxification s'en trouvent amoindris. Le risque global résulte donc d'équilibres subtils entre processus d'inactivation et d'activation métabolique (figure 1). Bon nombre d'études épidémiologiques révèlent aussi une dépendance des formes de cancers rapportées dans le Tableau I à certains facteurs de l'environnement tels que le tabagisme et/ou l'exposition professionnelle. Cela tend à indiquer que ce type de risque pharmacogénétique ne s'exprime en général (voire toujours?) qu'après une exposition chronique et prolongée.

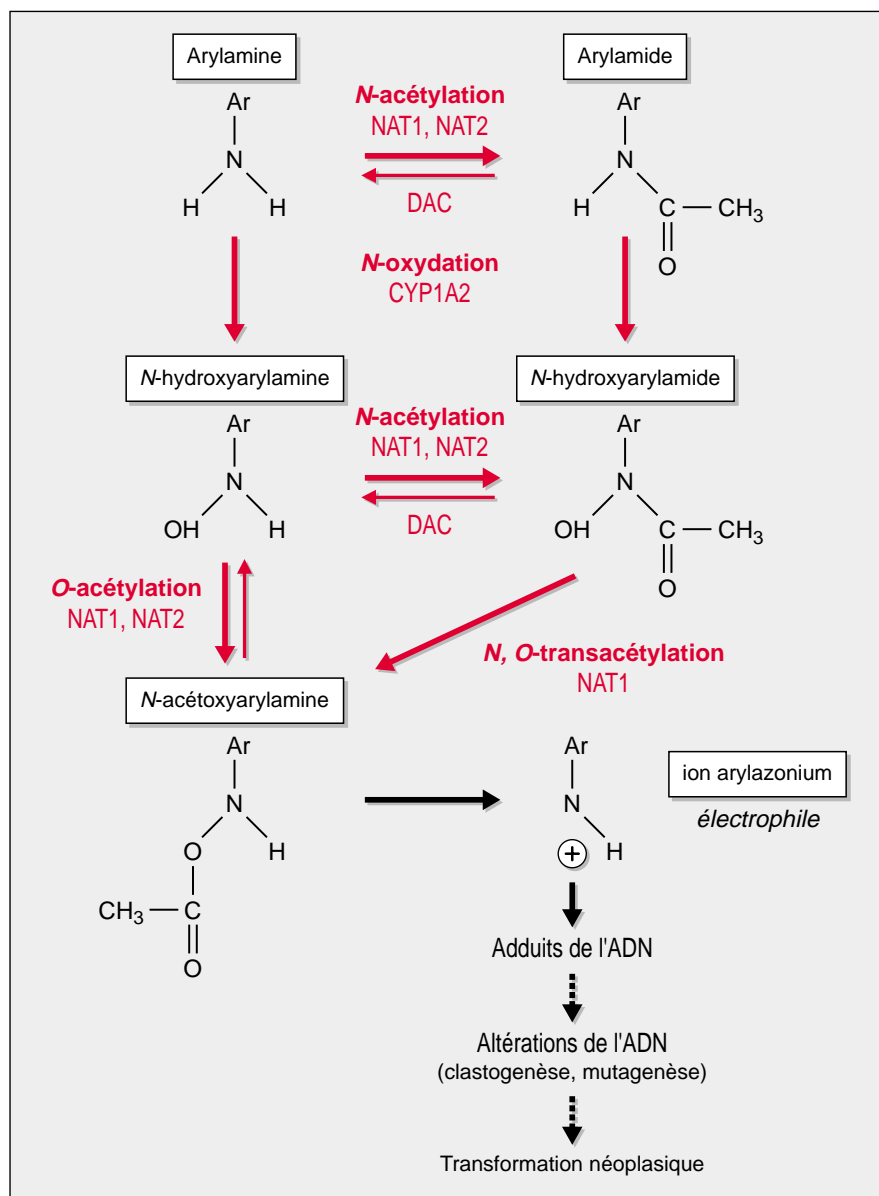


Figure 5. Schéma simplifié des voies métaboliques d'activation des précancérogènes chimiques de type arylamine. (D'après [41].) Plusieurs voies enzymatiques peuvent s'associer pour produire des métabolites réactifs à partir de précancérogènes. La N-acétylation exercerait une détoxification relative des arylamines précancérogènes, en les rendant thermodynamiquement moins accessibles à l'oxydation. En revanche, la O-acétylation serait plutôt activatrice, de même que la N-hydroxylation catalysée par des mono-oxygénases à cytochrome P-450 (dont le CYP1A2). Les réactions de N- et O-acétylation et de N,O-transacétylation seraient catalysées plus ou moins sélectivement par NAT1 et NAT2. Ces cascades réactionnelles conduiraient à un même intermédiaire acétoxyarylamine instable se décomposant spontanément en ions arylazonium hautement électrophiles. Des réactions catalysées par des désacétylases (DAC) microsomiales ainsi que des activités cyclooxygénase, glucuronyltransférase et sulfotransférase (non représentées ici) pourraient moduler la quantité d'adduits formés et donc la probabilité de cancérisation. L'ensemble des activités enzymatiques de ce schéma n'est pas exprimé dans tous les tissus. Ainsi, la N-oxydation est essentiellement hépatique, tandis que NAT2 est principalement produite au niveau du foie et du côlon, et que NAT1 semble l'être au niveau de nombreux tissus, de même que l'activité DAC.

gée à un ou plusieurs xénobiotiques à potentialité cytotoxique. Certaines de ces associations à risque semblent aussi impliquer d'autres enzymes de biotransformation. En particulier, l'absence de glutathion S-transférase (GST) de type M1 (homozygotie de l'allèle « nul ») apparaît souvent comme un facteur de susceptibilité, notamment vis-à-vis du mésothéliome, du cancer colo-rectal ou du cancer de la vessie [26]. Rappelons à ce propos que l'activité des enzymes de biotransformation s'exerce majoritairement au niveau du foie (cas de NAT2), véritable « plaque tournante » du métabolisme des xénobiotiques mais également au niveau périphérique (cas de NAT1 et GSTM1). Les molécules toxiques rencontrées dans un tissu donné proviennent donc souvent de métabolites hépatiques transportés par les voies biliaire ou sanguine, mais peuvent aussi être engendrées par des processus entièrement locaux. Dans ce dernier cas, il semble que NAT1, ubiquitaire, puisse jouer un rôle modulateur encore trop peu exploré. Jusqu'à présent, la mise en évidence expérimentale des processus de génotoxicité dépendant des activités NAT1 et NAT2 a été effectuée à l'aide de tests de mutagenicité, en particulier à partir de souches de *Salmonella typhimurium* exprimant les séquences codantes des gènes NAT humains [27]. La formation d'aduits de l'ADN a aussi pu être mesurée grâce à d'autres systèmes d'expression hétérologue, chez *E. coli* [28] ou dans des cellules COS-1 [29]. Ces modèles pourraient constituer la base de tests fonctionnels plus sophistiqués. Il s'agirait plus précisément de systèmes d'expression combinée de plusieurs enzymes *a priori* impliqués dans la biotransformation d'un composé donné : par exemple, une mono-oxygénase à cytochrome P-450 et une NAT synthétisées au sein des mêmes cellules [30]. Outre l'intérêt de cette approche en toxicologie et en pharmacologie, elle pourrait permettre d'élucider des questions importantes telles que la nature des mécanismes séquentiels de biotransformation. Des aspects plus spécifiques concernant l'activité des NAT pourraient être abordés, tels que la sélectivité et la coopérativité de NAT1 et NAT2, en particulier vis-à-vis

de substrats potentiellement métabolisés par les deux isoenzymes. Au premier rang de ces substrats figurent certaines formes N-hydroxylées d'amines hétérocycliques et cycliques potentiellement précancérogènes [31]. Il n'est pas exclu que des isoformes de NAT codées par certains allèles NAT1\* ou NAT2\* puissent présenter une sélectivité particulière vis-à-vis de certains substrats. Dans ce contexte, une meilleure connaissance des capacités catalytiques des variants naturels de NAT1 et de NAT2 pourrait permettre de tenter d'évaluer les risques cliniques résultant de certaines combinaisons de génotypes NAT1\* et NAT2\*.

### Potentialités d'expression des gènes NAT

À côté de la quasi-absence de données concernant d'éventuels inducteurs pharmacologiques de l'expression des gènes des N-acétyltransférases, quelques éléments sont disponibles quant à l'expression de ces gènes au cours du développement dans quelques espèces animales et chez l'homme. Ainsi, une activité arylamine N-acétyltransférase a été détectée dans différents tissus fœtaux humains [16] ainsi qu'au niveau du placenta, site privilégié de transit des xénobiotiques [12]. Ces activités, essentiellement de type NAT1, sont comparables sur le plan cinétique à celles mesurées dans les tissus adultes. Ces données laissent supposer que l'isoenzyme NAT1 pourrait jouer un rôle important dès le stade fœtal, au niveau de cellules différenciées ou non, éventuellement en présence de substrats encore méconnus. Parmi eux, des dérivés endogènes de l'acide folique seraient des substrats de NAT1 [32].

### Conclusions et perspectives

Pour conclure, soulignons que la multiplicité des réactions face aux agressions dues à des facteurs environnementaux, et en particulier des précancérogènes chimiques, ne saurait être réduite à la mise en cause d'un seul facteur, fût-ce une enzyme de biotransformation. Il est clair que la mise à jour de l'étiologie de ces mécanismes, par essence graduels et

multifactoriels, passe par une analyse poussée des interactions génome-environnement qui ne saurait être envisagée qu'à travers une approche globale et multidisciplinaire. Les outils de la génétique fournissent déjà des données précises capables de faire progresser nos connaissances. Les N-acétyltransférases constituent dans ce contexte un élément important d'un puzzle moléculaire dont de nombreuses pièces restent cependant à découvrir. Les enjeux de ces recherches sont importants tant en ce qui concerne la compréhension de certains mécanismes de cancérisation que dans le cadre de la mise au point de nouvelles molécules médicamenteuses ■

### RÉFÉRENCES

1. Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 269-96.
2. Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet* 1997; 60: 265-71.
3. Evans DAP. N-acetyltransferase. In: Kalow W, ed. *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*. New York: Pergamon Press, 1992: 95-178.
4. Grant DM, Mörke K, Eichelbaum M, Meyer UA. Acetylation pharmacogenetics. The slow acetylator phenotype is caused by decreased or absent arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J Clin Invest* 1990; 85: 968-72.
5. Larrey D. Polymorphisme génétique du métabolisme hépatique des médicaments. *Med Sci* 1986; 2: 364-72.
6. Beaune P. Les cytochromes p450 hépatiques humains. *Med Sci* 1986; 2: 358-63.
7. Rieder MJ, Shear NH, Kanee A, Tang BK. Predominance of slow acetylator phenotype among patients with sulfonamide hypersensitivity reactions. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49: 13-7.
8. Grant DM, Blum M, Beer M, Meyer UA. Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Mol Pharmacol* 1991; 39: 184-91.
9. Ilett KF, Ingram DM, Carpenter DS, Teillet CH, Lang NP, Kadlubar FF, Minchin RF. Expression of monomorphic and polymorphic N-acetyltransferases in human colon. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 914-7.
10. Stanley LA, Coroneos E, Cuff R, Hickman D, Ward A, Sim E. Immunohistochemical detection of arylamine N-acetyltransferase in normal and neoplastic bladder. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 1059-67.



## RÉFÉRENCES

11. Cribb AE, Grant DM, Miller MA, Spielberg SP. Expression of monomorphic arylamine N-acetyltransferase (NAT1) in human leukocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259: 1241-6.
12. Derewlany LO, Knie B, Koren G. Arylamine N-acetyltransferase activity of the human placenta. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269: 756-60.
13. Sadrieh N, Davis CD, Snyderwine EG. N-acetyltransferase expression and metabolic activation of the food-derived heterocyclic amines in the human mammary gland. *Cancer Res* 1996; 56: 2683-7.
14. Hickman D, Risch A, Buckle V, Spurr NK, Jeremiah SJ, McCarthy A, Sim E. Chromosomal localization of human genes for arylamine N-acetyltransferase. *Biochem J* 1994; 297: 441-5.
15. Vatsis KP, Weber WW, Bell DA, Dupret JM, Evans DAP, Grant DM, Hein DW, Lin HJ, Meyer UA, Relling MV, Sim E, Suzuki T, Yasuschi Y. Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 1-17.
16. Pacifici GM, Bencini C, Rane A. Acetyltransferase in humans: development and tissue distribution. *Pharmacology* 1986; 32: 283-91.
17. Dupret JM, Grant DM. Site-directed mutagenesis of recombinant human arylamine N-acetyltransferase expressed in *Escherichia coli*. Evidence for direct involvement of Cys<sup>68</sup> in the catalytic mechanism of polymorphic human NAT2. *J Biol Chem* 1992; 267: 7381-5.
18. Deloménie C, Goodfellow GH, Krishnamoorthy R, Grant DM, Dupret JM. Study of the role of the highly conserved Arg<sup>9</sup> and Arg<sup>64</sup> in the catalytic function of human N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 by site-directed mutagenesis. *Biochem J* 1997; 323: 207-15.
19. Dupret JM, Goodfellow GH, Janezic SA, Grant DM. Structure-function studies of human N-acetyltransferases NAT1 and NAT2. Functional analysis of recombinant NAT1/NAT2 chimeras expressed in *E. Coli*. *J Biol Chem* 1994; 269: 26830-5.
20. Grant DM, Tang BK, Kalow W. A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1984; 17: 459-64.
21. Deloménie C, Sica L, Grant DM, Krishnamoorthy R, Dupret JM. Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2\*) gene locus in two native African populations. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 177-85.
22. Grant DM, Vohra P, Avis Y, Ima A. Detection of a new polymorphism of human arylamine N-acetyltransferase NAT1 using p-aminosalicylic acid as an *in vivo* probe. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1992; 3 (suppl): 244.
23. Wolkenstein P, Carrière V, Charue D, Bastuji-Garin S, Revuz J, Roujeau JC, Beaune P, Bagot M. A slow acetylator genotype is a risk factor for sulphonamide-induced toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 255-8.
24. Deloménie C, Grant D, Mathelier-Fusade P, Jacomet C, Leynadier F, Jacqz-Aigrain E, Rozenbaum W, Krishnamoorthy R, Dupret JM. N-acetylation genotype and risk of severe reactions to sulphonamides in AIDS patients. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 38: 581-2.
25. Guengerich FP. Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol Ther* 1992; 54: 17-61.
26. d'Errico A, Taioli E, Chen X, Vineis P. Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer: a review of the literature. *Biomarkers* 1996; 1: 149-73.
27. Grant DM, Josephy PD, Lord HL, Morrison LD. *Salmonella typhimurium* strains expressing human arylamine N-acetyltransferases: metabolism and mutagenic activation of aromatic amines. *Cancer Res* 1992; 52: 3961-4.
28. Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Feng Y, Ferguson RJ, Grant DM. Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1633-8.
29. Probst MR, Blum M, Fasshauer I, D'Orazio D, Meyer UA, Wild D. The role of the human acetylation polymorphism in the metabolic activation of the food carcinogen 2-amino-3-methylimidazo(4,5-f) quinoline (IQ). *Carcinogenesis* 1992; 13: 1713-7.
30. Guengerich FP, Gillam EMJ, Shimada T. New applications of bacterial systems to problems in toxicology. *Crit Rev Toxicol* 1996; 26: 551-83.
31. Hein DW, Rustan TD, Ferguson RJ, Doll MA, Gray K. Metabolic activation of aromatic and heterocyclic N-hydroxyarylamines by wild-type and mutant recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases. *Arch Toxicol* 1994; 68: 129-33.
32. Minchin RF. Acetylation of p-aminobenzoyleglutamate, a folic acid catabolite, by recombinant human arylamine N-acetyltransferase and U937 cells. *Biochem J* 1995; 307: 1-3.
33. Ratain MJ, Mick R, Berezin F, Janisch L, Schilsky RL, Williams SF, Smiddy J. Paradoxical relationship between acetylator phenotype and azafluorene toxicity. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 50: 573-9.
34. Brockmüller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res* 1996; 56: 3915-25.
35. Agundez JAG, Oliveira M, Ladero JM, Rodriguez-Lescure A, Ledesma MC, Diaz-Rubio M, Meyer UA, Benitez J. Increased risk for hepatocellular carcinoma in NAT2-slow acetylators and CYP2D6-rapid metabolizers. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 501-12.
36. Hirvonen A, Pelin K, Tammilehto L, Karjalainen A, Mattson K, Linnainmaa K. Inherited GSTM1 and NAT2 defects as concurrent risk modifiers in asbestos-related human malignant mesothelioma. *Cancer Res* 1996; 95: 2981-3.
37. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Michalek AM, Laughlin R, Nemoto T, Gillenwater KA, Harrington AM, Shields PG. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms, and breast cancer risk. *JAMA* 1996; 276: 1494-1501.
38. Orzechowska-Juzwenko K, Milejski P, Patkowski J, Nittner-Marszalska M, Malolepszy J. Acetylator phenotype in patients with allergic diseases and its clinical significance. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1990; 28: 420-5.
39. Roberts-Thomson IC, Ryan P, Khoo KK, Hart WJ, McMichael AJ, Butler RN. Diet, acetylator phenotype, and risk of colorectal neoplasia. *Lancet* 1996; 347: 1372-4.
40. Cascorbi I, Brockmüller J, Mrozikiewicz PM, Bauer S, Loddenkemper R, Roots I. Homozygous rapid arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotype as a susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 3961-6.
41. Grant DM. Molecular genetics of the N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 1993; 3: 45-50.

### Remerciements

Le travail réalisé dans le laboratoire de l'Inserm U. 458 a été soutenu par un contrat d'équipement de la Ligue Nationale contre le Cancer. Nous remercions Erick Denamur pour sa lecture critique du manuscrit.

### Accès à la base de donnée internationale en Immunogénétique : IMGT/LIGM-DB

La base de données IMGT/LIGM-DB (Immunoglobulines et Récepteurs T) qui, avec HLA-DB (Julia Bodmer, ICFR, Londres), appartient à la base de données internationale ImMunoGeneTics IMGT, est accessible, depuis le 10 juillet 1995, sur le serveur WWW du CNUC (<http://imgt.cnusc.fr:8104>). IMGT/LIGM-DB contient à ce jour plus de 9 000 séquences (6 860 séquences d'immunoglobulines et 2 410 de récepteurs T) de 61 espèces différentes. Les fichiers à plat des séquences annotées (900) sont accessibles sur les serveurs ftp anonyme (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/imgt>) et WWW (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/imgt>) d'EMBL-EBI, depuis le 24 juin 1995.

#### Contact :

Pr. Marie-Paule Lefranc, Coordinateur de IMGT  
Tél. : 67.61.36.34. Fax : 67.04.02.31/45.  
E-mail : [lefranc@ligm.crbm.cnrs-mop.fr](mailto:lefranc@ligm.crbm.cnrs-mop.fr)

## Summary

### Arylamine *N*-acetyltransferases : genetic polymorphism and susceptibility to xenobiotics

Interindividual variability in the metabolism of xenobiotics, including drugs and environmental pollutants, is in part due to genetic polymorphisms of enzymes involved in biotransformation. Pharmacogenetics focuses on their study. In man, two arylamine *N*-acetyltransferases, NAT1 and NAT2, are among the best documented examples of polymorphic biotransformation enzymes. Their genes, *NAT1* and *NAT2*, both located on chromosome 8p21.3-23.1, have very similar sequences and may be the products of an ancestral gene duplication. *NAT1* is expressed in various tissues, whereas *NAT2* is mostly expressed in liver and intestine and is the best-studied polymorphic locus. Enzyme variants produced by this gene polymorphism have functional properties that dictate the «slow» or «rapid» acetylator phenotypes. The implications of this polymorphism for both therapeutics and cancerology have been extensively studied. The «slow acetylator» phenotype is often associated with adverse drug reactions. Particular genetic combinations of NATs and other biotransformation enzymes have also been associated with susceptibility to some non iatrogenic pathologies including cancers. The mechanisms of detoxification and/or activation of xenobiotics involve both inactivating conjugation and synthesis of reactive ions capable of binding to cellular macromolecules. The study of NAT structure-function relationships may contribute to our understanding of these mechanisms.



## Pour vaincre les maladies génétiques dites lysosomales

Deuxième congrès scientifique  
à Dijon, les 22, 23, 24 janvier 1997

L'association « Vaincre les maladies lysosomales » organise, en collaboration avec son Conseil Scientifique et son Comité de Pédiatres, le 2<sup>e</sup> Congrès Scientifique sur ces maladies d'origine génétique dont on dénombre une trentaine de pathologies différentes (Leucodystrophie métagénétique, Fabry, Gaucher, Hürler, Sanfilippo, Krabbe...).

L'objectif de ce deuxième Congrès Scientifique est de porter à la connaissance du corps médical et scientifique une information produite par des spécialistes sur les thèmes suivants :

- *Physiopathologie*
- *Diagnostic*
- *Génétique et apport de la biologie moléculaire*
- *Thérapies symptomatiques et spécifiques*
- *Prise en charge des malades, consultations multidisciplinaires*



Pour ceux qui cherchent et qui soignent, VML finance des **bourses de recherches** (14 en 1996) et des **programmes d'études** (12 en 1996), de nombreuses **manifestations médicales**, un **journal pour les pédiatres**, un **ouvrage médical** faisant référence sur le sujet des maladies lysosomales. De plus, VML dispose d'un Conseil Scientifique de haut niveau et d'un Comité de Pédiatres pour l'aider dans ces différentes actions.

Pour ceux qui souffrent, l'association a permis la mise en place de **Consultations Multidisciplinaires** créées en collaboration avec les services hospitaliers et permettant à l'enfant malade de rencontrer en même temps et dans un même lieu l'ensemble des médecins intervenant dans sa prise en charge. De même, une permanence téléphonique au service des familles, des malades et des professionnels de santé a été créée en 1996: le **service FARE** (Faculter Accueillir Renseigner Écouter).

**Information VML**

Anne RAUCAZ - 01 60 91 75 00

TIRÉS À PART

J.M Dupret.