

THESE
pour le
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par
Réjane Troudet

Présentée et soutenue publiquement le 25/10/2013

**Mise au point et intérêt de l'étude des
polymorphismes du gène *CYP2D6* chez les patients
traités par méthadone**

Président : M. Alain Pineau, PU-PH en Toxicologie

Faculté de pharmacie de Nantes

Membres du jury : M. Stéphane Bézieau, PU-PH en Génétique

Faculté de médecine de Nantes

M. Régis Bouquié, PA-Attaché de faculté en Pharmacologie

Faculté de médecine de Nantes

Mme Marie Bronnec, PH en Addictologie, Nantes

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mes co-directeurs de thèse Stéphane Bézieau et Régis Bouquié pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de leurs laboratoires de Génétique Moléculaire et de Pharmacologie. Un grand merci pour vos relectures méticuleuses et pour vos suggestions avisées qui m'ont sans aucun doute permis de mieux assimiler mon sujet et de préciser mes propos.

Je remercie particulièrement Fabrice Airaud pour sa collaboration active dans la rédaction de la partie non bibliographique, pour le temps passé à m'expliquer la complexité de la génétique, pour ses nombreux conseils et sa bonne humeur communicative.

Je tiens également à remercier Marie Bronnec pour m'avoir fait découvrir le monde de l'addictologie, pour sa gentillesse et ses remarques pertinentes.

J'adresse aussi mes remerciements à toute l'équipe de Génétique Moléculaire pour m'avoir accueillie chaleureusement une seconde fois et pour m'avoir apporté leur aide précieuse et leur soutien pendant la partie pratique de ma thèse.

Merci à toute l'équipe de Pharmacologie pour leur sympathie, et pour m'avoir trouvé un endroit idéal pour travailler.

Mes remerciements vont enfin à ma famille et à mes amis pour leur soutien incontestable qui m'a permis de ne jamais dévier de mon objectif. Merci à mes parents et à ma sœur Pauline pour leur présence exceptionnelle pendant ces quatre mois.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
LISTE DES TABLEAUX.....	7
LISTE DES ABBREVIATIONS	8
LEXIQUE.....	11
AVANT PROPOS.....	13

INTRODUCTION	15
--------------------	----

<i>PARTIE I : ADDICTION ET DEPENDANCE</i>	15
---	----

1. Qu'entendons-nous par addiction et dépendance ?	15
1.1. Définitions	15
1.2. Epidémiologie des addictions	16
1.3. Bases physiologiques et neurobiologiques de l'addiction	17
1.3.1. Dépendance et système de récompense	18
1.3.2. Mécanismes d'altérations neurobiologiques	21
1.3.3. Addiction et mémoire	23
1.3.4. Le rôle du cortex préfrontal dans la « perte de contrôle »	23
1.3.5. Le stress, un facteur déclenchant	24
1.3.6. Mécanismes cellulaires et moléculaires	25
1.4. Diagnostic de l'addiction	28
1.5. Les déterminants des pratiques addictives.....	29
1.5.1. Facteurs liés à la substance	30
1.5.2. Facteurs individuels de vulnérabilité et de résistance	31
1.5.3. Facteurs de risques socio-environnementaux	32
2. La dépendance aux opiacés	33
2.1. Que signifie le terme d'« opiacés » ?	33
2.2. Les récepteurs opioïdes	34
2.3. Les peptides opioïdes endogènes.....	36
2.4. Diversification des consommations d'opiacés	38
2.4.1. L'héroïne.....	38
2.4.2. Autres opiacés consommés	39
2.4.3. Risques associés.....	40
3. Traitement : une prise en charge biopsychosociale.....	40
3.1. Evaluation globale	41
3.2. Qu'est-ce que le TSO ?.....	42
4. La méthadone	44
4.1. Généralités	44
4.1.1. Bases structurales.....	44
4.1.2. Indication et mode d'action	45
4.1.3. Effets secondaires et contre-indications.....	45
4.1.4. Evolution des formes galéniques	46
4.2. Pharmacocinétique de la méthadone	47
4.2.1. Absorption.....	47
4.2.2. Distribution dans l'organisme	47
4.2.3. Métabolisme de la méthadone.....	47
4.2.4. Elimination	49

4.3.	Traitement de maintenance par la méthadone (TMM).....	49
4.3.1.	Précautions d'admission	49
4.3.2.	Induction et dose de sécurité.....	49
4.3.3.	Phase de maintenance	49
4.3.4.	Suivi du TMM.....	50
4.3.5.	Phase dégressive	50
4.4.	Variation de l'efficacité du TMM en clinique.....	50
PARTIE II : PHARMACOGENETIQUE DU CYP 2D6.....		52
1.	Présentation générale des cytochromes P450.....	52
1.1.	Historique	52
1.2.	Classification	52
1.3.	Structure et localisation	54
1.1.	Cycle réactionnel	55
1.2.	Rôle dans la détoxification de xénobiotiques	57
2.	Etude du CYP 2D6.....	59
2.1.	Présentation générale du CYP 2D6	59
2.1.1.	Historique.....	59
2.1.2.	Structure et locus du gène <i>CYP2D</i>	60
2.1.3.	Caractéristiques générales.....	61
2.1.4.	Rôles physiologiques	62
2.1.5.	Phylogénie et évolution des loci <i>CYP2D</i>	63
3.	Polymorphisme génétique du CYP2D6 et impacts fonctionnels	65
3.1.	Définition d'un polymorphisme génétique.....	65
3.2.	Polymorphismes génétiques du CYP2D6.....	67
3.2.1.	Différents phénotypes observés en clinique	67
3.2.2.	Variants alléliques du <i>CYP2D6</i> et nomenclature.....	70
3.2.3.	Allèles fonctionnels	71
3.2.3.1.	Allèles associés à une fonction enzymatique normale	71
3.2.3.2.	Allèles associés à une fonction enzymatique réduite	72
3.2.3.3.	Allèles associés à une fonction enzymatique accrue.....	72
3.2.4.	Allèles non fonctionnels	73
3.2.5.	Gènes hybrides.....	74
3.2.6.	Gradient Nord/Sud dans l'expression du <i>CYP2D6</i>	75
3.3.	Conséquences de la relation génotype/phénotype en clinique	78
OBJECTIFS		80
MATERIELS ET METHODES		81
1.	Choix des échantillons à tester	81
2.	Description des méthodes utilisées pour la détection des polymorphismes génétiques.....	81
2.1.	Régions testées	81
2.2.	MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>)	81
2.3.	HRM (<i>High Resolution Melting</i>).....	84
2.4.	Design des oligonucléotides pour l'amplification de l'exon 1	86
3.	Séquençage.....	87
RESULTATS ET INTERPRETATION		88
PARTIE I : VALIDATION DES EXPERIENCES		88

<i>PARTIE II : RESULTATS BRUTS</i>	88
1. MLPA.....	88
2. HRM.....	90
<i>PARTIE III : INTERPRETATION</i>	91
1. Données de MLPA	91
2. Données de HRM.....	95
2.1. Profils des ADN.....	95
3. Données de séquençage.....	95
 DISCUSSION	98
1. Méthodologie utilisée.....	98
1.1. Sélection des cibles.....	98
1.2. Mise au point des conditions de MLPA	98
1.3. Mise au point des conditions de HRM	98
1.4. Limites	99
2. Résultats obtenus.....	99
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	105
ANNEXES	106
BIBLIOGRAPHIE	119

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Anatomie dopaminergique cérébrale lors d'une consommation de substances psychoactives	19
Figure 2 : Système de récompense.....	20
Figure 3 : Activité des neurones dopaminergiques.	20
Figure 4 : Schéma synthétique du fonctionnement du cerveau addict et non addict	22
Figure 5 : Système général d'adaptation à un stress	24
Figure 6 : Activation et rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien lors d'un événement stressant.....	25
Figure 7 : Régulation de l'expression des gènes et contrôle transcriptionnel via le facteur de transcription CREB	27
Figure 8 : Fixation de l'hétérodimère Fos-Jun sur le site AP-1 d'une région promotrice spécifique de l'ADN, favorisant la transcription	27
Figure 9 : Triangle multifactoriel d'Olievenstein	30
Figure 10 : Récepteur à 7THM couplé à une protéine Gi.	35
Figure 11 : Peptides opioïdes endogènes et leur action sur les différents types de récepteurs opioïdes μ , δ , κ	37
Figure 12 : Effets des peptides opioïdes endogènes et des opiacés sur le système de récompense.....	38
Figure 13 : Production d'opium et trafic d'héroïne dans le monde entre 2002 et 2008.....	39
Figure 14 : Structure chimique de la méthadone, avec présence d'un carbone asymétrique... ..	44
Figure 15 : Enantiomères R et S de la méthadone	45
Figure 16 : Métabolisation de la méthadone au niveau hépatique.	48
Figure 17 : Classification des cytochromes P450	53
Figure 18 : Proportions relatives (en %) des CYP P450 au niveau hépatique et des médicaments métabolisés par ces CYP P450.....	54
Figure 19 : Représentation tridimensionnelle du CYP P450 2D6	55
Figure 20 : Structure de la NADPH cytochrome P450 réductase membranaire, composée de deux flavines, le FAD et le FMN	55
Figure 21: Schéma généralisé du système P450 dans les microsomes hépatiques	56
Figure 22: Cycle réactionnel des cytochromes P450	57
Figure 23 : Schéma général du métabolisme hépatique d'un xénobiotique.....	58
Figure 24: Effet de la biotransformation sur l'activité pharmacologique du médicament.....	59
Figure 25 : Structure du locus <i>CYP2D</i> , contenant trois gènes contigus <i>CYP2D6</i> , <i>CYP2D7P</i> et <i>CYP2D8P</i>	60
Figure 26 : Représentation schématique de l'interaction entre un substrat azoté et le résidu Asp-301 présent dans le site actif de l'enzyme	62
Figure 27 : Conservation inter-espèces des différents exons du gène du CYP2D6.....	64
Figure 28 : Evolution des gènes des loci Cyp2d chez la souris et des loci CYP2D chez l'homme, selon des alignements de séquences	64
Figure 29 : Trois types de polymorphismes peuvent être responsable de variations individuelles	66
Figure 30 : Présentation des différents phénotypes, associés aux génotypes, et leur distribution dans une population randomisée d'origine européenne	69
Figure 31 : Structures des allèles fonctionnels et non fonctionnels du <i>CYP2D6</i>	71
Figure 32 : Arrangements géniques du <i>CYP2D6</i> , <i>CYP2D7P</i> et <i>CYP2D8P</i>	75
Figure 33 : Fréquence des allèles fonctionnels, non fonctionnels chez les populations caucasiennes, africaines, afro-méricaines et asiatiques.....	76

Figure 34 : Distribution mondiale (en %) des allèles portant des duplications ou multiduplications du gène <i>CYP2D6</i> .	77
Figure 35 : Mécanisme proposé d'une sélection des allèles portant de multiples copies du gène <i>CYP2D6</i> actif en rapport avec le régime alimentaire chez des populations du Nord-Est de l'Afrique	78
Figure 36 : Relations génotype-phénotype du <i>CYP2D6</i> et conséquences sur la pharmacocinétique et la clinique	79
Figure 37 : Description des différentes étapes d'une MLPA	83
Figure 38 : Electrophorégrammes tirés du logiciel GeneMapper® (ABI), comparant par superposition les pics de trois individus pour différentes sondes.	84
Figure 39 : Principe de la PCR <i>touchdown</i> et de l'analyse HRM	85
Figure 40 : Principe des homo- et des hétéroduplexes, décrits dans la méthode HRM	86
Figure 41 : Analyse HRM de la courbe de fusion après amplification par PCR et détection des homo- et des hétéroduplexes	86
Figure 42 : Séquences de l'exon 1 du <i>CYP2D6</i> , <i>CYP2D7P</i> et <i>CYP2D8P</i>	87
Figure 43 : Analyse HRM tirés du LC480.	90
Figure 44 : Electrophorégrammes (P1) tirés du logiciel GeneMapper, duplication totale du gène <i>CYP2D6</i> .	93
Figure 45 : Electrophorégrammes (T3) tirés du logiciel GeneMapper, délétion totale du gène <i>CYP2D6</i> .	93
Figure 46 : Proportions relatives pour un allèle des duplications totales, partielles et des délétions totales.	94
Figure 47 : Electrophorégrammes (P2) tirés de GeneMapper.	95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Estimation du nombre de consommateurs (en millions) de substances psychoactives parmi les 11-75 ans, 2010-2011.....	16
Tableau 2 : Estimation (en %) du nombre d'expérimentateurs et d'usagers dans l'année de substances psychoactives parmi les 18-64 ans, en France métropolitaine, 2010.....	17
Tableau 3 : Classification des opioïdes selon leur origine, leur propriété et leur activité.	34
Tableau 4 : Effets biologiques principaux des opioïdes en fonction de leur affinité pour les différents types de récepteurs μ , δ , κ	36
Tableau 5 : Fréquence (en %) de l'usage d'opiacés parmi les usagers des structures socio-sanitaires en 2010-2011.....	40
Tableau 6 : Méthadone et buprénorphine, modalités de prescriptions, contraintes légales et recommandations cliniques	43
Tableau 7 : Profil pharmacologique de la méthadone et de la buprénorphine	43
Tableau 8 : Comparaison des longueurs et du pourcentage de similarité des nucléotides des exons et des introns entre les gènes <i>CYP2D6</i> , <i>CYP2D7P</i> et <i>CYP2D8P</i>	61
Tableau 9 : Substrats et inhibiteurs du <i>CYP2D6</i>	63
Tableau 10: Fréquences des métaboliseurs lents et des métaboliseurs ultra-rapides dans différentes populations..	70
Tableau 11 : Fréquence des allèles portant des gènes <i>CYP2D6</i> actifs dupliqués ou multidupliqués, comparée chez des suédois, des allemands, des espagnols et des éthiopiens	73
Tableau 12 : Nombre de copies des exons 1, 4, 5, 6 et 9ds.....	89
Tableau 13 : Résultats du séquençage de l'exon 1 du <i>CYP2D6</i> des 3 ADN contrôles et de 32 ADN provenant du laboratoire de Génétique.....	91
Tableau 14 : Résultats de séquençage pour les sept variants dans l'intron 1.....	97

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACTH : *Adreno-Cortico-Trophic Hormone*
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP : Adénosine diphosphate
AMM : Autorisation de mise sur le marché
AMPC : Adénosine monophosphate cyclique
AP-1: *Activator Protein 1*
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
AS-PCR: PCR allèle spécifique
ATP: Adénosine triphosphate
ATV: Aire Tegmentale Ventrale
BHE: Barrière-hémato-encéphalique
CBP: *CREB-Binding Protein*
CHU: Centre hospitalier universitaire
CIM: Classification Internationale des Maladies
CNV: *Copy number variation*
CRE: *cAMP Response Element*
CREB: *cAMP Response Element Binding protein*
CRH: *Corticotropin-Releasing Hormone*
CSST : Centre de Soins Spécifiques pour Toxicomanes
CYP: cytochrome
DbSNP: *Database of Single-Nucleotide Polymorphism*
DGV: *Database of Genomic Variants*
DLT: Dépression à long terme
DOP: *Delta Opioid Peptide*
ds: *Downstream*
DSM: *Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders*
DSM-IV: *Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders, fourth edition*
ECG: Électrocardiogramme
EDDP: 2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine
EM: *Extensive metabolizer*

EMDP: 2-éthyl-5-méthyl-3,3-diphényl-pyrrolidine

ESCAPAD: Enquête sur la Santé et les Consommations lors de l'Appel de Préparation À la Défense

FAD: Flavine adénine dinucléotide

FMN: Flavine mononucléotide

GABA: acide γ -aminobutyrique

HRM: *High Resolution Melting*

7HTM: 7 Hélices Trans-Membranaires

IM: *Intermediate metabolizer*

INPES: Institut national de prévention et d'éducation pour la santé

KOP: *Kappa Opioid Peptide*

LPH: *Lipotropin Hormone*

LSD: *Lysergic acid diethylamide*

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MOP: *Mu Opioid Peptide*

MR: *Metabolic Ratio*

MSH: *Melanocyte Stimulating Hormone*

NADPH: *Nicotine adenine diphosphonucleotide*

NMDA: *N-methyl-D-aspartate*

NGS: *Next Generation Sequencing*

NOP: *Nociceptin Opioid Peptide*

OFDT : Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OPAL: *Opiates and PhArmacoLogy*

OPPIDUM: Observation des produits psychotropes ou détournés de leur utilisation médicamenteuse

ORL1: *Opioid Receptor-Like 1*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

Pgp : *P- glycoprotein*

PLT : Potentialisation à long terme

PM: *Poor metabolizer*

POMC: Pro-opio-mélano-cortine

RCP: Résumé des caractéristiques du produit

RCPG: Récepteur couplé aux protéines G

RECAP : Recueil Commun sur les Addictions et les Prises en charge

RFLP-PCR: *Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction*

SNP: *Single-Nucleotide Polymorphism*

TMM: Traitement de maintenance à la méthadone

TSO : Traitement de Substitution aux Opiacés

UDP: Uridine diphosphate

UM: *Ultrarapid metabolizer*

UNODC: United Nations Office on Drugs and Crime

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

VSSS-MT: *Verona Service Satisfaction Scale for Methadone Treatment*

LEXIQUE (Kaplan, 1993)

Allèles : variantes alternatives d'un même gène différant par leur séquence nucléotidique.

Amplicon : produit de PCR correspondant à l'amplification d'une région d'intérêt.

Chromosome : élément microscopique constitué de molécules d'ADN et de protéines. Dans les cellules eucaryotes, les chromosomes, support de l'information génétique, se trouvent dans le noyau et contiennent les gènes permettant leur distribution égale dans les deux cellules filles lors de la division cellulaire.

Délétion : perte d'une ou plusieurs paires de bases consécutives sans rupture de continuité de la molécule d'ADN.

Duplication : copie accidentelle de tout ou partie du génome ensuite conservée dans la même cellule.

Exon : séquence de gène dont le transcrit persiste dans l'ARN messager mûr après maturation du transcrit primaire. Chaque exon représente une séquence codante et traduite continue, sauf aux extrémités qui ne sont pas traduites (en 5' : en amont de l'ATG, codon initiateur de la traduction et en 3' : en aval du premier codon stop).

Gène : ensemble des séquences d'acide nucléique contenant l'information pour la production régulée d'un ARN particulier (transcription) ou d'une chaîne polypeptidique particulière (transcription-traduction).

Génotypage : détermination de l'identité d'une variation génétique, à une position spécifique sur tout ou partie du génome, pour un individu ou un groupe d'individus donné.

Génotype : constitution génétique d'un individu.

Haplotype : assortiment d'allèles à des locus différents, mais proches, sur un même chromosome.

Hétérozygotie : situation génotypique où deux loci homologues d'une même paire chromosomique portent chacun un allèle différent.

Homozygotie : présence du même allèle sur les deux chromosomes d'une même paire chromosomique.

Insertion : mutation génétique caractérisée par l'enchâssement de matériel génétique dans un chromosome.

Intron : séquence d'ADN transcrite et secondairement éliminée par épissage au cours de la maturation des ARN.

Locus : emplacement d'un segment d'ADN sur un chromosome, défini par son contenu informationnel (gène), ou sa séquence qu'elle soit ou non polymorphe.

Mutation : désigne n'importe quel changement intervenu dans la séquence d'ADN. S'il ne concerne qu'une seule base, on parle de mutation ponctuelle.

Phénotype : manifestation apparente de la constitution du génome sous la forme d'un trait morphologique, d'un syndrome clinique, d'une variation qualitative ou quantitative du produit final d'expression d'un gène (protéine).

Polymorphisme génétique : présence dans une population d'au moins deux variantes alléliques d'un locus génétique, explorables par analyse de l'ADN (polymorphisme génotypique) ou par analyse du produit protéique (polymorphisme phénotypique).

Pseudogène : séquence non exprimée d'ADN présentant une grande homologie avec un gène actif, dont il dérive par duplication/mutation ou par rétrotranscription. Sa non-expression résulte de modifications structurales.

Séquençage : détermination de l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN (gène, chromosome voire génome entier).

AVANT PROPOS

La méthadone est une molécule utilisée comme traitement de substitution dans les pharmacodépendances majeures aux opiacés. Elle est produite dans de nombreux pays et peut être utilisée légalement, sur ordonnance, comme substitut aux opiacés mais également comme analgésique. Le bénéfice clinique de la méthadone, en tant que traitement de substitution, a été mis en évidence depuis les années 1960 mais des variabilités inter-individuelles ont été rapidement observées. De nombreuses études ont cherché la ou les causes de cette variabilité. Il a été démontré qu'une telle variabilité de la réponse aux médicaments dépend de nombreux facteurs : des facteurs environnementaux (alimentation, interaction médicamenteuse, tabac, alcool), l'état du malade (pathologies associées, âge), des posologies mal adaptées ou mal suivies mais également des déterminants génétiques. Tous ces facteurs peuvent être à l'origine de différences dans le métabolisme de la méthadone. La méthadone est métabolisée par plusieurs cytochromes P450, dont le cytochrome 2D6, exprimé majoritairement dans le foie et présentant de nombreux polymorphismes. Les différentes formes polymorphiques de ce cytochrome aboutissent à la production d'une enzyme plus ou moins active, ce qui peut avoir des conséquences dans le métabolisme de la méthadone, et dans celui de tous les autres substrats du cytochrome 2D6. Une modification de l'activité de l'enzyme joue un rôle majeur puisqu'elle crée un déséquilibre du traitement de substitution chez les patients souffrant d'addiction aux opiacés. Un tel déséquilibre peut avoir des conséquences cliniques importantes, telles que le développement de co-addictions, et doit donc être évité.

La pharmacogénétique, étudiant l'influence du patrimoine génétique sur le devenir des médicaments dans l'organisme, est déjà utilisée pour affiner les indications thérapeutiques de certains médicaments. Des études ayant assimilées les notions de pharmacologie, de pharmacocinétique et de pharmacogénétique suggèrent que les variants enzymatiques du cytochrome 2D6 et l'interaction d'autres médicaments qui l'inhibent, influenceraient les concentrations plasmatiques et l'efficacité clinique du traitement. En particulier, les patients qui présentent des polymorphismes du cytochrome 2D6 entraînant une augmentation de fonctionnalité enzymatique, c'est-à-dire un métabolisme ultra-rapide, auraient un risque plus élevé de déséquilibre du traitement par méthadone. Le génotypage du gène *CYP2D6*, associé au phénotypage, est devenu un sujet d'intérêt du fait de son potentiel à prédire les résultats cliniques avant l'initiation d'un traitement de substitution par méthadone. En théorie, il

permettrait une individualisation thérapeutique en sélectionnant les patients pouvant bénéficier au maximum de l'efficacité de la méthadone par l'adaptation adéquate des posologies.

L'objectif de ma thèse est de mettre au point une approche génétique permettant de déterminer le génotype de chaque patient, par la mise en évidence des polymorphismes responsables du métabolisme ultra-rapide chez les patients sous traitement de maintenance par la méthadone.

Dans un premier temps, après avoir examiné de plus près le phénomène de l'addiction et le traitement de substitution par la méthadone, nous nous sommes intéressés au rôle du polymorphisme génétique du cytochrome 2D6 (CYP2D6) dans le métabolisme et à sa relation plus ou moins bien établie avec le phénotype observé en clinique.

Dans un second temps, nous avons réalisé la mise au point de techniques de biologie moléculaire, permettant de déterminer le génotype de patients provenant de la population générale.

Enfin, la dernière partie consistera à déterminer si ces méthodes de génotypage sont adaptées et si elles ont un réel intérêt en clinique en vue d'une médecine personnalisée.

INTRODUCTION

PARTIE I : ADDICTION ET DEPENDANCE

1. Qu'entendons-nous par addiction et dépendance ?

1.1. Définitions

Une confusion existe souvent entre addiction et dépendance. Pour certains, dépendance et addiction ont la même signification, pour d'autres, l'addiction recouvre un champ plus vaste, incluant aussi l'abus.

On entend par dépendance « l'impossibilité de s'abstenir de consommer » une ou plusieurs substances psychoactives (Reynaud, 2006).

Deux types de dépendance sont distingués :

- la dépendance psychique, définie par un malaise psychique qui pousse l'individu à continuer la consommation, souvent non plus pour éprouver les sensations de plaisir, de bien-être et de satisfaction de la substance, mais pour éviter de ressentir les sensations désagréables engendrées par l'arrêt de la consommation. Cette dépendance psychique a pour caractéristique principale le *craving*, c'est-à-dire la recherche compulsive de la substance exprimant un besoin majeur et incontrôlable de consommer.
- la dépendance physique, qui correspond à un besoin irrépressible, obligeant le sujet à la consommation de la substance pour éviter le syndrome de manque lié à la privation du produit. Elle se caractérise par l'existence d'un syndrome de sevrage (avec apparition de troubles physiques intenses liés au manque), et le développement d'une tolérance (nécessité d'augmenter les doses pour obtenir un même effet).

L'addiction ne touche, contrairement à la dépendance, qu'une fraction des consommateurs chroniques de substances psychoactives. Elle est définie par l'impossibilité répétée de contrôler un comportement (tel que la consommation d'une substance) et la poursuite de ce

comportement en dépit de la connaissance de ses conséquences négatives sur la santé mais aussi sur la vie sociale de l'individu.

Selon ces définitions, il peut donc exister des personnes addictes à des comportements mais non-dépendantes à une substance (addiction au jeu, au sexe, achats compulsifs...). En revanche, s'il y a dépendance, on parle forcément d'addiction.

1.2. Epidémiologie des addictions

Les enquêtes de population générale, menées sur des échantillons représentatifs d'adolescents et d'adultes, permettent de donner des estimations du nombre de consommateurs de substances psychoactives dans l'ensemble de la population (Tableau 1).

	Cannabis	Cocaïne	Ecstasy	Héroïne	Alcool	Tabac	Méd. psychotropes*
Expérimentateurs	13,4 M	1,5 M	1,1 M	500 000	44,4 M	35,5 M	16 M
dont usagers dans l'année	3,8 M	400 000	150 000	//	41,2 M	15,8 M	11 M
dont usagers réguliers	1,2 M	//	//	//	8,8 M	13,4 M	//
dont usagers quotidiens	550 000	//	//	//	5,0 M	13,4 M	//

// : non disponible

Définitions :

Expérimentation = au moins un usage au cours de la vie, usage dans l'année = au moins un usage au cours de l'année, usage régulier = au moins trois consommations d'alcool dans la semaine, tabac quotidien et consommation de cannabis au moins 10 fois au cours du mois et au moins 120 fois au cours de l'année.

* Pour les médicaments psychotropes l'estimation concerne les 18-75 ans.

Tableau 1 : Estimation du nombre de consommateurs (en millions) de substances psychoactives parmi les 11-75 ans, 2010-2011 (d'après l'enquête ESCAPAD 2011, OFDT, <http://www.ofdt.fr/ofdtdev/live/donneesnat/escapad.html>).

Selon l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT), pour tous les types d'usage, ce sont les produits licites, l'alcool et le tabac ainsi que les médicaments psychotropes, qui demeurent les substances les plus consommées en France, avec 13,4 millions de fumeurs quotidiens et 5 millions de consommateurs quotidiens d'alcool, mais dont on ne sait dire avec précision combien parmi eux sont dépendants.

Par ailleurs, il y aurait entre 200 000 et 250 000 usagers réguliers de drogues dures (cocaïne, morphine, héroïne...) (Tableau 2).

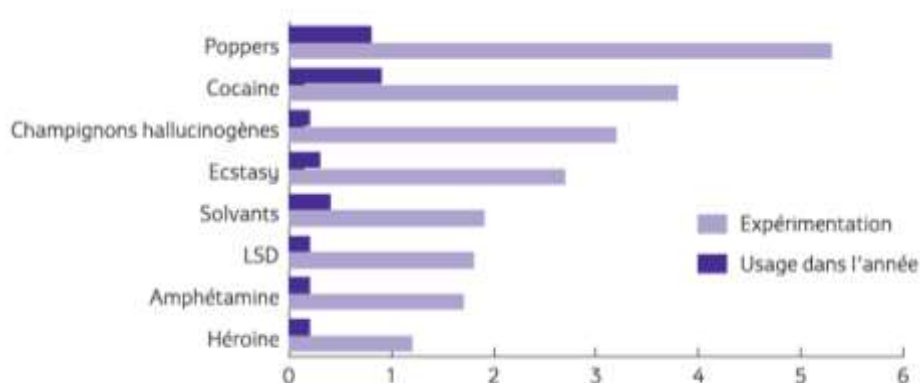


Tableau 2 : Estimation (en %) du nombre d'expérimentateurs et d'usagers dans l'année de substances psychoactives parmi les 18-64 ans, en France métropolitaine, 2010 (d'après Baromètre santé 2010, INPES, <http://www.inpes.sante.fr/Barometres/barometre-sante-2010/index.asp>).

L'usage de substances psychoactives diffère beaucoup suivant le sexe des consommateurs. D'une manière générale, les hommes sont plus concernés que les femmes (1 femme pour 4 hommes). Le caractère masculin des consommations est habituellement d'autant plus marqué que les usages sont intensifs. Les médicaments psychotropes sont la seule catégorie de produits pour laquelle les femmes sont plus consommatrices que les hommes (22,9% contre 13,4% d'usage dans l'année).

Les dépendances et/ou addictions peuvent donc survenir à tout moment de l'existence, mais la période de 15 à 25 ans est la plus propice à l'émergence des dépendances. Le comportement à risque des adolescents et des jeunes adultes facilite les premières expériences.

Au total, la consommation de substances psychoactives est responsable par an, en France, de plus de 100 000 décès par accident et maladie, selon le ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé (Le Moine, 2012). Le problème de santé publique posé par ces consommations est donc majeur.

1.3. Bases physiologiques et neurobiologiques de l'addiction

Grâce aux avancées significatives dans les domaines de la neuropsychologie, de la neurobiologie et de l'imagerie, les caractéristiques du sujet dépendant et/ou addict et les mécanismes d'altération du cerveau sont désormais bien décrits.

En effet, un « cerveau addict » ne fonctionne pas selon la norme, ce qui explique la difficulté, pour les sujets concernés, de contrôler leur comportement de consommation et, pour les cliniciens, de les traiter.

L'installation d'une conduite addictive reflèterait un défaut dans la régulation des schémas fonctionnels de réseaux neuronaux, permettant à l'homme de s'adapter à son environnement.

1.3.1. Dépendance et système de récompense

Les altérations neurobiologiques touchent des circuits vitaux primordiaux, ceux de la gestion du plaisir et de la souffrance et ceux des émotions, et se situent principalement au niveau du système dopaminergique mésocorticolimbique, appelé « système de récompense ». Ce système, programmé et formaté dès l'enfance, gère nos désirs, nos plaisirs et nos émotions.

En effet, quel que soit la substance psychoactive, les mécanismes de dépendance empruntent des voies communes de renforcement, probablement identiques à celles qui renforcent nos comportements fondamentaux.

Toutes les structures impliquées dans le système de récompense appartiennent au système dopaminergique mésocorticolimbique et jouent un rôle déterminant dans les processus d'appétence, motivationnels et décisionnels (Adinoff, 2004).

Le circuit mésolimbique, situé dans le tronc cérébral au niveau de l'aire tegmentale ventrale (ATV), implique un ensemble de neurones dopaminergiques, appelés neurones A10, qui projettent vers des structures du système limbique telles que le noyau accumbens, l'amygdale et l'hippocampe. Ce circuit joue un rôle primordial dans les effets de renforcement, dans la mémoire et dans les réponses conditionnées liées aux conséquences motivationnelles et émotionnelles du manque et du besoin.

Le circuit mésocortical inclut des projections de l'ATV vers le cortex préfrontal et le septum. Il serait, quant à lui, impliqué dans les conséquences cognitives de l'imprégnation émotionnelle et, en ce qui concerne la prise de substances psychoactives, dans la recherche compulsive au détriment d'autres intérêts et désirs.

Des études d'imagerie cérébrale ont montré que toutes les substances susceptibles d'induire une dépendance activent les circuits dopaminergiques mésocorticolimbiques et augmentent la concentration extra-cellulaire de dopamine, en particulier dans le noyau accumbens (Figure 1) (Di Chiara & Imperato, 1988).

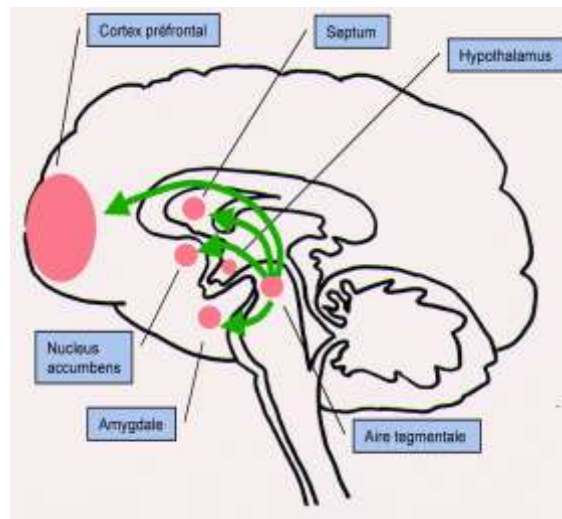


Figure 1 : Anatomie dopaminergique cérébrale lors d'une consommation de substances psychoactives. Il y a augmentation de la concentration extracellulaire de dopamine à partir de l'ATV vers le noyau accumbens, l'amygdale, l'hypothalamus, le septum et le cortex préfrontal (d'après <http://www.centres-pharmacodependance.net/grenoble/ORITHYE/Neurobio/Neurobio.htm>).

La dopamine est le neurotransmetteur clé du système de récompense. Les récompenses naturelles (aliments, boisson) et la majorité des substances addictives modifient la transmission dopaminergique en stimulant la libération de dopamine.

En effet, l'arrivée d'un signal annonçant une récompense, après traitement sensoriel par le cortex, modifie l'activité de certains neurones de l'ATV. Ceux-ci libèrent de la dopamine dans les différentes structures du circuit mésocorticolimbique. Chaque structure a un rôle plus ou moins défini : le noyau accumbens intervient dans l'activation motrice, le cortex préfrontal est, lui, impliqué dans la focalisation de l'attention et la prise de décisions (Figure 2). Ces différentes zones sont interconnectées et innervent l'hypothalamus, l'informant de la présence d'une récompense.

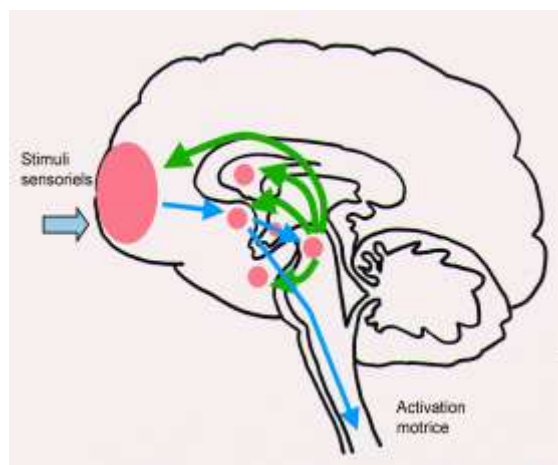


Figure 2 : Système de récompense. La dopamine peut être libérée en présence d'une récompense (plaisir procuré par la substance) ou en présence d'un signal sensoriel associé à une récompense, et entraîne une activation motrice intensifiée, médiée par le noyau accumbens, pour rechercher de façon compulsive cette récompense (d'après <http://www.centre-pharmacodependance.net/grenoble/ORITHYE/Neurobio/Neurobio.htm>).

Le seuil autour duquel fluctue l'activité des neurones libérant la dopamine est fondamental dans l'attitude face aux substances psychoactives. La base de ce seuil, propre à chacun d'entre nous, dépend de facteurs génétiques et dépend à la fois d'événements antérieurs (lors des premières années du développement) et des réactions du cerveau à l'environnement immédiat. En fonction de la récompense, la concentration dopaminergique varie (Figure 3). Elle augmente dans l'anticipation/attente de la récompense, augmente encore lors de la récompense et ne retrouve son état basal qu'après l'obtention de celle-ci (satisfaction). En revanche, une absence de récompense, malgré le signal annoncé, entraîne une activité dopaminergique en dessous de ce seuil (manque).

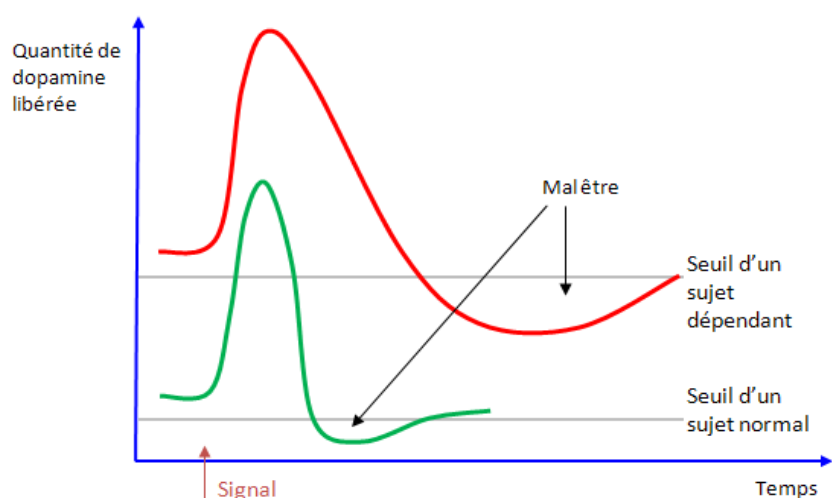


Figure 3 : Activité des neurones dopaminergiques (d'après <http://www.centre-pharmacodependance.net/grenoble/ORITHYE/Neurobio/Neurobio.htm>).

Par ailleurs, dans le cas des récompenses naturelles, l'activité neuronale dopaminergique ne dure que quelques instants, mais dans le cas de l'administration d'une substance psychoactive, la libération de dopamine est beaucoup plus longue et entraîne le déplacement de l'équilibre neuronal, en associant une sensation plus intense de plaisir à un changement des concentrations synaptiques de dopamine.

L'usage prolongé de cette substance crée un nouvel état d'équilibre émotionnel et modifie peu à peu les effets subjectifs de la substance. Au cours du développement de la dépendance, on observe une diminution progressive de la sensation de plaisir produite par l'administration de la substance, accompagnée d'une augmentation de la sensation de malaise quand la substance n'est plus présente dans l'organisme.

La conséquence de ce phénomène est que les consommateurs excessifs vont être finalement incités à consommer la substance, plutôt pour palier ces malaises émotionnels que pour obtenir les effets positifs de celle-ci.

Pour compenser cette sur-stimulation anormale et répétée du système dopaminergique, des systèmes de compensation, appelés systèmes opposants, vont être activés, afin d'essayer de réduire les effets de cette sur-stimulation (Kalivas & Nakamura, 1999).

1.3.2. Mécanismes d'altérations neurobiologiques

Même si le système de récompense paraissait être l'élément primordial dans les phénomènes de dépendance, il a été mis en évidence que le fonctionnement du cerveau addict s'appuyait finalement sur un déséquilibre entre quatre circuits, qui interagissent ensemble en situation normale (Figure 4) (Volkow *et al.*, 2003):

- le circuit de la récompense
- le circuit motivationnel et sensoriel
- le circuit de la mémoire
- le circuit de contrôle cortical

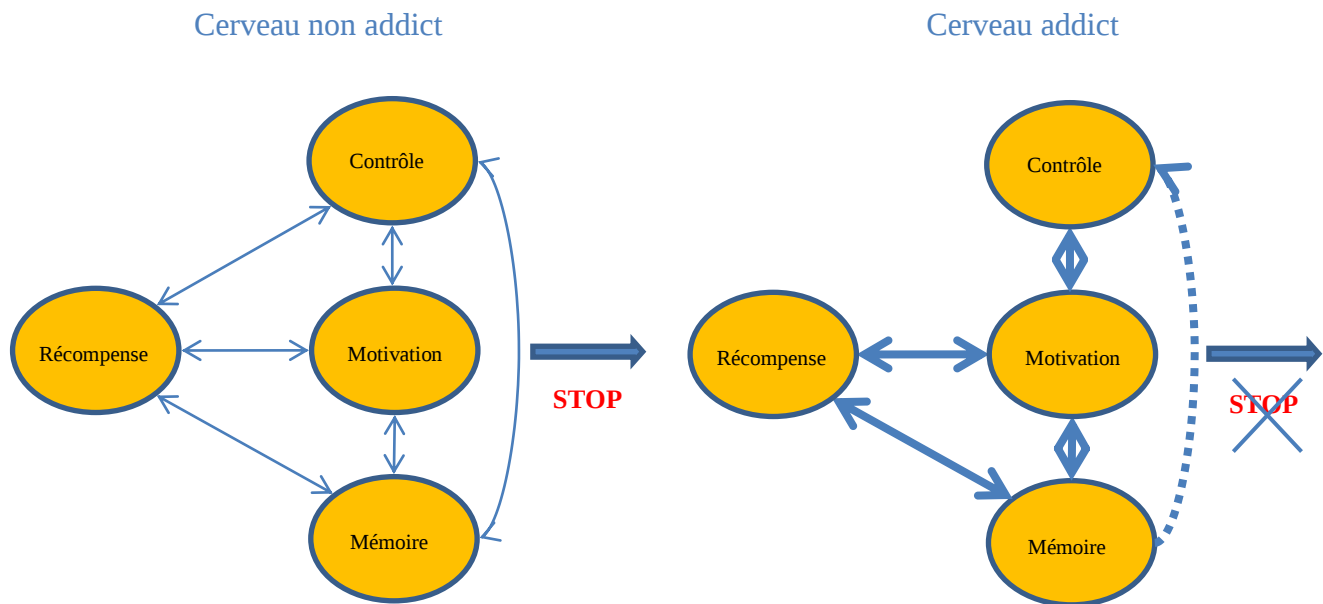


Figure 4 : Schéma synthétique du fonctionnement du cerveau addict et non addict (d'après Volkow *et al.*, 2003)

Le circuit de la récompense donne la valeur d'un besoin associé au produit, celui de la motivation répond aux états internes, celui de la mémoire met en jeu les associations et les conditionnements acquis et celui du contrôle cortical permet de résoudre les conflits internes. En cas d'addiction, on assiste à un renforcement de la valeur du produit, à la survalorisation du besoin et de la motivation à se procurer la substance. L'envahissement des systèmes de mémoire, dû à un conditionnement, s'accompagne d'une déconnexion partielle voire totale du contrôle inhibiteur, exercé au niveau du cortex préfrontal par les associations corticales. Le cerveau devient hyper-sensibilisé à la substance et aux stimuli environnementaux, où tous les objectifs deviennent secondaires par rapport au besoin obsédant du produit.

Ces quatre circuits se modulent les uns les autres, ce qui explique que les nombreux phénomènes qui entrent en jeu sont si complexes. Il est cependant possible d'envisager que tel ou tel système soit préférentiellement défaillant, ou potentiellement sollicité selon la génétique, l'environnement ou la personnalité du patient avant d'aboutir dans une voie finale commune : la dépendance, état dans lequel l'ensemble de ces systèmes, du fait de leurs interrelations, est dysrégulé.

1.3.3. Addiction et mémoire

L'état addictif se traduit non seulement par l'importance accordée à la substance, mais également par l'ancrage en mémoire des « indices » qui lui sont associés (objet, personne, lieu rappelant la consommation). Ces indices s'ancrent tellement profondément en mémoire qu'ils pourront à eux seuls déclencher la recherche de substance et sa consommation. Chez les sujets « accros », le comportement n'est plus motivé par le but (obtenir l'effet) mais dépend d'une automatisation et est influencé par les indices qui ont été associés par le passé à la consommation du produit. Dans ce cas, la personne enchaîne des associations automatiques de type stimulus-réponse, dans lesquelles elle n'a plus accès aux conséquences de son comportement (Waelti *et al.*, 2001).

Le renforcement de cet apprentissage « stimulus-réponse » expliquerait le taux élevé de rechute de patients qui rencontrent des indices associés à la prise de substances.

Les progrès dans la compréhension du rôle de la dopamine dans l'apprentissage lié à une récompense ont permis d'émettre l'hypothèse d'un modèle d'« apprentissage pathologique » (Schultz *et al.*, 1997). De plus, des analyses sur l'action de la dopamine et sur les mécanismes cellulaires et moléculaires ont suggéré des similitudes entre les actions des substances addictives et les formes normales de l'apprentissage et de la mémoire (Nestler, 2002 ; Montague *et al.*, 2004).

Les comportements avec des objectifs enrichissants, liés à l'obtention de récompenses souhaitées, ont tendance à persister fermement et se renforcent positivement, en devenant sur-appris. L'addiction serait donc une conséquence de l'usurpation, par les substances psychoactives, des mécanismes neuronaux d'apprentissage et de mémoire.

1.3.4. Le rôle du cortex préfrontal dans la « perte de contrôle »

Le cortex préfrontal, au centre des mécanismes cérébraux essentiels de prise de décision, de contrôle et d'inhibition, est affecté par l'exposition prolongée et abondante à une substance psychoactive. En effet, des études de neuro-imagerie ont montré une baisse de l'activité de base du cortex préfrontal chez des sujets ayant développé une addiction à différentes substances psychoactives (Volkow & Fowler, 2000). Si l'on présente à ces mêmes personnes des « indices » liés à leur substance d'addiction, l'activité de leur cortex augmente de manière

bien plus significative que lors de la présentation d' « indices » liés à une récompense plus ordinaire.

Le cortex préfrontal, à cause de la dysfonction amygdalienne et du dérèglement du contrôle inhibiteur, semble devenu, dans ce cas, incapable de déclencher la recherche de récompenses naturelles et d'empêcher les comportements impulsifs-compulsifs de recherche de la substance psychoactive (Goldstein & Volkow, 2002).

1.3.5. Le stress, un facteur déclenchant

Chez l'homme, le stress peut entraîner le passage d'une consommation occasionnelle d'une substance psychoactive à un usage compulsif (Schwabe *et al.*, 2011). En effet, cette vulnérabilité accrue est liée à l'intense activation des neurones dopaminergiques mésolimbiques par les hormones du stress, via l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Figure 5). Le cerveau, soumis à un événement perturbateur stressant, stimule l'hypothalamus, qui sera responsable d'une double activation, par la sécrétion d'hormones du stress appartenant, d'une part au groupe des corticoïdes (CRH, *Corticotropin-Releasing Hormone* ; ACTH, *Adreno-Cortico-Trophic Hormone*) et d'autre part, au groupe des neuromédiateurs (adrénaline et noradrénaline). La sécrétion de neuromédiateurs adrénergiques et noradrénergiques constitue une phase d'alarme, face au stress, et se produit au niveau périphérique via le système autonome sympathique (médullosurrénales) et au niveau central via l'activation directe du locus coeruleus, qui stimule l'amygdale et les régions préfrontales.

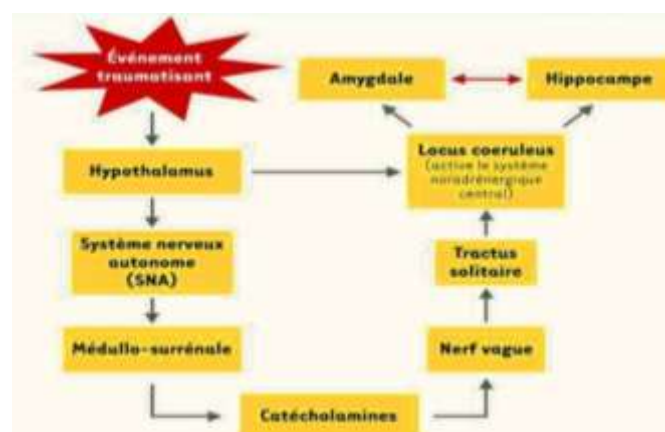


Figure 5 : Système général d'adaptation à un stress (d'après Maheu & Lupien, 2003)

Si l'agent stressant perdure, le système endocrinien prend le relais (Figure 6). Le cerveau stimule alors l'hypothalamus qui sécrète la CRH, qui elle-même stimule l'hypophyse qui

sécrète l'ACTH, qui active la sécrétion de glucocorticoïdes par les corticosurrénales, et notamment le cortisol (Koob, 1999). Les récepteurs aux glucocorticoïdes sont très abondants dans le cerveau et en particulier dans l'hippocampe et l'hypothalamus, deux structures impliquées dans le contrôle de notre humeur et dans notre capacité à ressentir du plaisir. Lors de conduites addictives, le rétrocontrôle négatif, pour stopper la sécrétion d'hormones et de neuromédiateurs liés au stress, n'est plus présent. Ces systèmes semblent donc réellement impliqués dans le développement de la dépendance. Leur dysrégulation persiste durant les abstinences prolongées et ils sont réactivés avec l'avènement d'un état de stress, augmentant ainsi le risque de rechute.

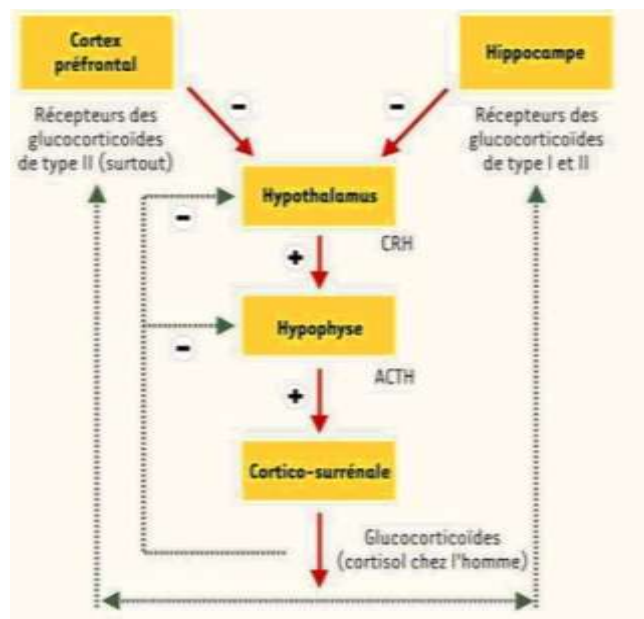


Figure 6 : Activation et rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien lors d'un événement stressant (d'après Maheu & Lupien, 2003)

1.3.6. Mécanismes cellulaires et moléculaires

Au niveau cellulaire, de nombreux travaux se sont focalisés sur les changements induits par les substances psychoactives dans la transmission synaptique dopaminergique. L'idée de base est que la compulsion et sa persistance, après abstinence, résultent de la perturbation des mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans la mémoire. L'exposition répétée à un produit augmenterait les effets « récompensants », ce qui entrainerait des changements structuraux au sein de la transmission dopaminergique au niveau de l'ATV pour son induction et au niveau du noyau accumbens pour son maintien (Ito *et al.*, 2004). De plus, une plasticité synaptique a été démontrée : une potentialisation (PLT) et une dépression à long terme (DLT)

peuvent être provoquées au niveau des synapses excitatrices sur les neurones A10 dans l'ATV et sur ceux du noyau accumbens, avec activation des récepteurs NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) glutamatergiques (Nestler, 2001).

Par ailleurs, la régulation de l'expression des gènes est considérée comme un mécanisme plausible des conduites addictives, dans laquelle une exposition prolongée à une substance psychoactive causerait des changements neurologiques à long terme, maintenant le phénomène addictif. En effet, les altérations neurobiologiques, évoquées précédemment, et les changements morphologiques de certains neurones seraient médiés en partie par des changements dans l'expression de certains gènes, notamment via plusieurs facteurs de transcription.

Plusieurs études se sont intéressées aux rôles joués par deux principaux facteurs de transcription, CREB (*cAMP response element binding protein*) et Δ FosB (*Fos family*). Ces facteurs sont retrouvés au sein du système de récompense et dans des zones cérébrales qui régulent normalement les réponses d'un individu à des récompenses naturelles (nourriture, sexe, interaction sociale) et qui sont modifiées par l'exposition chronique à des substances psychoactives (Nestler, 2004 ; Kelley, 2004). Les perturbations synaptiques, provoquées par un produit psychoactif, entraînent des changements dans les cascades intracellulaires et des modifications au niveau nucléaire, via l'action des facteurs de transcriptions.

Ces facteurs de transcriptions, en se fixant sur les régions promotrices de gènes cibles, régulent l'expression de ces mêmes gènes, notamment au niveau du noyau accumbens, structure clé dans le phénomène addictif (Nestler, 2012).

Le facteur de transcription CREB est l'un des plus étudiés en neurosciences. Une fois phosphorylé par une kinase, CREB s'homodimérise et vient se fixer sur une région promotrice spécifique de l'ADN, CRE (*cAMP response element*). Le recrutement d'une autre protéine liant CREB, CBP (*CREB-binding protein*), permet ainsi l'activation de la transcription (Figure 7).

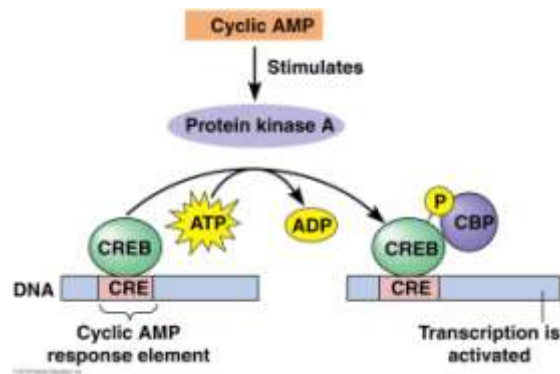


Figure 7 : Régulation de l'expression des gènes et contrôle transcriptionnel via le facteur de transcription CREB (d'après Zhang *et al.*, 2005)

L'up-régulation de la cascade AMPc-dépendante et l'activation de CREB par les substances psychoactives ont été observées dans plusieurs structures cérébrales, dont certaines sont primordiales dans le phénomène d'addiction (Nestler, 2012). L'augmentation de l'activité de CREB dans le locus coeruleus serait responsable de la dépendance physique aux opiacés et du syndrome de manque (Guitart *et al.*, 1992). Par ailleurs, les systèmes motivationnels et de rechute dépendraient de l'activation de CREB dans le noyau accumbens (Nestler, 2004). CREB est donc impliqué dans l'apparition d'une forme de tolérance et contribue à un état émotionnel négatif durant les phases précoces du syndrome de manque.

Δ FosB, qui appartient à la famille de facteurs de transcription Fos, s'hétérodimérise avec un facteur de la famille Jun pour former un complexe de facteurs de transcription avec AP-1, (*Activator Protein 1*) qui se fixe sur les sites AP-1 d'une région promotrice spécifique de l'ADN (Figure 8) (Hope *et al.*, 1994).

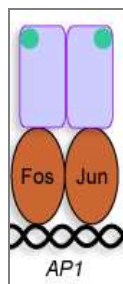


Figure 8 : Fixation de l'hétérodimère Fos-Jun sur le site AP-1 d'une région promotrice spécifique de l'ADN, favorisant la transcription (d'après http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_1/PCEM2/mod-integres/MI6_regulation_hormonale_chronobiologie/Ressources_locale/bio-cell/biocell_cours1.htm).

L'administration, même aiguë de substances psychoactives, entraîne l'augmentation de Δ FosB et Jun dans le noyau accumbens et le striatum (Moratalla *et al.*, 1996). Δ FosB est le

seul facteur stable de la famille Fos, il va donc persister longtemps dans ces structures cérébrales, même en cas d'arrêt de la consommation de produits psychoactifs. Il serait donc à l'origine d'une sensibilisation prolongée à l'exposition de substances et serait impliqué dans les comportements motivationnels et compulsifs, présents dans les conduites addictives (Nestler, 2004).

1.4. Diagnostic de l'addiction

Le champ de la santé mentale n'a cessé de s'étendre ces dernières décennies. Auparavant centrée sur les pathologies lourdes, la psychiatrie a petit à petit investi un nombre important de comportements qui ont une composante sociale. Les addictions connaissent aussi cette évolution. En effet, le terme d'addiction apparaît initialement en psychiatrie pour désigner les toxicomanies, regroupant alors les comportements d'utilisation pathologique de substances telles que les drogues, les médicaments et l'alcool. Son utilisation va progressivement s'étendre à d'autres catégories cliniques, présentant des similitudes au niveau comportemental.

Avec l'entrée de la dépendance dans le DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) et la CIM (Classification Internationale des Maladies), de nouvelles perspectives se sont ouvertes. L'addiction, vue d'abord comme un problème moral, a progressivement été considérée comme une maladie mentale, permettant de nombreuses avancées significatives.

Pour chaque trouble mental, des critères diagnostiques spécifiques, définis dans le DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition*), sont proposés pour servir de guide dans la démarche diagnostique. Le but du DSM-IV est de fournir une description des signes et des symptômes des maladies mentales et d'offrir un outil diagnostique fiable pour les psychiatres et les autres cliniciens.

Il existe ainsi sept critères de dépendance selon la quatrième révision du DSM :

- (1) la tolérance, définie par l'un des symptômes suivants :
 - (a) besoin de quantités notablement plus fortes de la substance pour obtenir une intoxication ou l'effet désiré.
 - (b) effet notablement diminué en cas d'utilisation continue d'une même quantité de la substance.

- (2) le sevrage, caractérisé par l'une ou l'autre des manifestations suivantes :
- (a) syndrome de sevrage caractéristique de la substance.
 - (b) la même substance (ou une substance très proche) est prise pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage.
- (3) la substance est souvent prise en quantité plus importante ou pendant une période plus prolongée que prévu.
- (4) il y a désir persistant, ou des efforts infructueux, pour diminuer ou contrôler l'utilisation de la substance.
- (5) beaucoup de temps est passé à des activités nécessaires pour obtenir la substance, à utiliser le produit, ou à récupérer de ses effets.
- (6) des activités sociales, professionnelles ou de loisirs, importantes sont abandonnées ou réduites à cause de l'utilisation de la substance.
- (7) l'utilisation de la substance est poursuivie bien que la personne sache avoir un problème psychologique ou physique persistant ou récurrent susceptible d'avoir été causé ou exacerbé par la substance.

La manifestation d'au moins trois de ces critères permet d'établir un diagnostic de dépendance à une substance psychoactive.

1.5. Les déterminants des pratiques addictives

Pourquoi et qu'est ce qui nous pousse ou nous freine à consommer des substances psychoactives ? Il n'est pas toujours facile de répondre précisément à ces questions. Le produit est souvent pointé comme le responsable unique et exclusif des addictions. Cette vision exagère le rôle du produit dans le développement d'une addiction, et omet de prendre en compte d'autres facteurs qui influencent de façon variable les consommations de substances.

Elaborée par le Docteur Olievenstein, l'idée d'un « triangle addictif multifactoriel » permet d'appréhender la consommation de substances dans une vision globale et souligne qu'il existe de multiples voies d'entrée dans l'addiction et de ce fait, de multiples voies de sortie. Selon cette approche, les usages et les addictions qui peuvent en découler résultent d'une rencontre entre une personne (personnalité) et un produit dans un contexte socioculturel déterminé (Figure 9).

Le contexte socioculturel est celui qui favorise ou non la consommation, la personnalité est plus ou moins disposée et prédisposée, enfin le produit lui-même est plus ou moins addictif.

L'addiction est donc considérée comme résultante de l'interaction de trois facteurs, qui s'influencent mutuellement (Reynaud *et al.*, 2000 ; Reynaud, 2010):

- des facteurs liés à la substance
- des facteurs individuels de vulnérabilité et de résistance
- des facteurs de risques socio-environnementaux

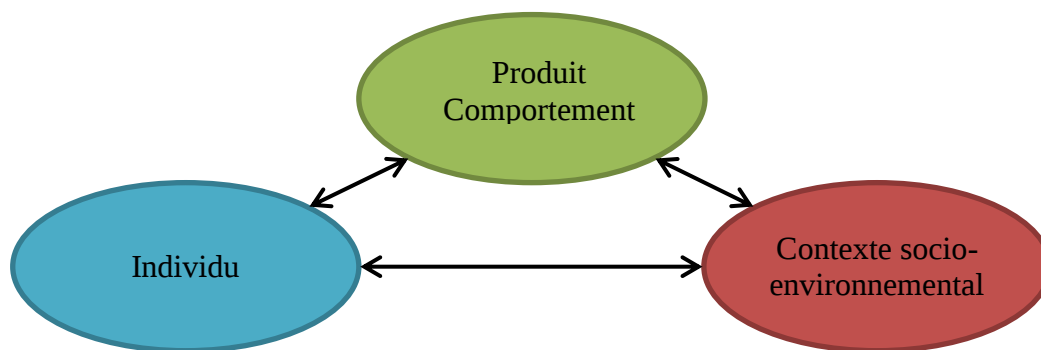


Figure 9 : Triangle multifactoriel d'Olievenstein

1.5.1. Facteurs liés à la substance

Les substances psychoactives sont naturellement consommées pour leurs effets mais leur usage présente toujours des risques et des dangers. Ces effets, risques et dangers varient d'un produit à l'autre, mais aussi selon l'usage qui en est fait, selon la sensibilité, l'état physique et psychique du consommateur et selon les circonstances de la consommation.

Les effets varient donc selon la nature de la substance. On les classe selon trois catégories principales : les dépresseurs, les stimulants et les hallucinogènes. Par ailleurs, selon la dose absorbée et le contexte d'utilisation, certaines substances peuvent présenter des effets de plusieurs catégories.

Chaque substance psychoactive présente un potentiel de nuisance dans trois domaines, entraînant des complications somatiques (physiques), psychologiques et sociales à court et long terme :

- un potentiel intoxicant : composé d'un potentiel intoxicant somatique, c'est-à-dire capable de léser certains organes (tabac) pouvant aller jusqu'à la mort par overdose

(cocaïne), et un potentiel intoxicant psychique, pouvant être révélateur de troubles psychologiques, lors de l'arrêt de la consommation.

- un potentiel agressogène : suppression des inhibitions et sentiment de toute-puissance qui conduisent à surestimer ses capacités et son appréciation du danger, et entraînant le passage à l'acte (agressions, violences conjugales et familiales) ainsi que des accidents (professionnels, domestiques, accidents de la route). C'est le cas des hallucinogènes par exemple (LSD, champignons...).
- un potentiel addictif : propriété d'une substance de conduire à la dépendance, qui peut être physique et/ou psychique. Le potentiel addictif est variable selon les substances, en puissance et en rapidité d'installation, mais toujours présent. Très rapide pour certaines substances (opiacés), il se manifeste plus ou moins vite pour les autres produits en fonction du mode de consommation et de l'état psychique de l'utilisateur.

Ces complications sont d'autant plus importantes et marquées lors de polyconsommations.

Par ailleurs, le statut social de la substance psychoactive, qui dépend du caractère licite ou illicite et du type de produit, est également un facteur de risque à prendre en compte. En effet, des substances illicites (héroïne, cocaïne) peuvent entraîner une marginalisation, une délinquance et des complications liées aux difficultés à se procurer le produit. De plus, l'acceptation sociale et juridique des substances licites (alcool, tabac) facilite et encourage leur consommation.

1.5.2. Facteurs individuels de vulnérabilité et de résistance

La bonne connaissance de ces facteurs de risques individuels est primordiale puisqu'elle va permettre des actions de prévention ciblées sur les contextes de vulnérabilité propres à chaque individu et constitue également un élément diagnostique et pronostique de toute première importance.

Les traits de personnalité et le tempérament peuvent être des facteurs de risque individuels d'installation d'une conduite addictive.

En effet, une faible estime de soi, la timidité, l'autodépréciation, des réactions émotionnelles excessives, des difficultés à faire face aux événements et à établir des relations stables et satisfaisantes peuvent entraîner une sensibilité aux « effets apaisants » de certaines substances (alcool, médicaments antidépresseurs).

La recherche de sensations, de nouveautés, de réactivité émotionnelle, un faible évitement du danger, un faible niveau de sociabilité, un retour lent à l'équilibre après un stress conduisent plutôt à une sensibilité aux « effets plaisirs stimulants » d'autres substances (cocaïne, amphétamines).

Les facteurs neurobiologiques entrent en jeu dans la vulnérabilité à la consommation de substances psychoactives, de façon directe ou indirecte (psychopathologies), via des perturbations au niveau des systèmes dopaminergique, opioïde, noradrénergique et corticotrope. L'exposition à des événements stressants augmente le risque de prise du produit. D'autres, comme les facteurs génétiques, auraient une influence sur le métabolisme et l'effet des substances psychoschoactives, contribuant au développement de l'addiction. Les interactions gènes-environnement participeraient d'ailleurs, de manière indissociable, à l'expression de la vulnérabilité aux consommations.

L'association de troubles psychiatriques aux conduites addictives (anxiété, phobie, vécu dépressif, troubles de l'humeur, tendance suicidaire), notamment chez les adolescents et les jeunes adultes, a fait l'objet de nombreuses études, mais les liens qui les unissent restent encore complexes (Kessler *et al.*, 1996 ; Farrell *et al.*, 2001). L'existence de troubles psychiatriques, selon les études, multiplieraient par deux le risque d'abus ou de dépendance à une substance psychoactive. Dans 70% des cas, ces troubles précèdent l'apparition d'une dépendance.

Enfin, certains événements de vie peuvent jouer un rôle dans la vulnérabilité individuelle à consommer des produits de manière addictive. Il peut s'agir d'un deuil, d'une rupture sentimentale, de maltraitance, d'abus sexuels ou bien encore de l'absence de domicile fixe.

1.5.3. Facteurs de risques socio-environnementaux

Le contexte social dans lequel nous vivons influence en grande partie nos comportements. Les modifications sociétales observées sont tournées aujourd'hui vers la valorisation médiatique, le culte de la performance, l'instantanéité des relations, les technologies de la communication, les comportements impulsifs, valeurs qui favorisent l'apparition de conduites addictives.

Le fonctionnement intrafamilial, les liens familiaux et le style d'éducation parentale de type négligeant, rejetant, permissif, influencent l'installation d'une conduite addictive. De plus, il existe des liens étroits entre une histoire familiale de dépendance à des produits psychoactifs et un âge de début précoce des consommations nocives. La tolérance familiale pour l'usage de produits psychoactifs et pour la transgression des règles familiales (faible niveau d'encadrement et d'autorité, violences intrafamiliales) et de la société sont également un facteur de risque de début de consommation de substances chez l'enfant et l'adolescent.

Le rôle du groupe de pairs (amis) est indiscutable dans l'initiation de la consommation de certaines substances psychoactives (tabac, alcool...). Les différentes enquêtes ESCAPAD (Enquête sur la Santé et les Consommations lors de l'Appel de Préparation À la Défense) menées par l'OFDT montrent bien que le choix du groupe de pairs et ses valeurs, les conduites délinquantes, la marginalisation et la représentation du produit par le jeune sont prédicteurs du passage de l'expérimentation à la dépendance.

Enfin, la fracture avec le système social et la perte des repères sociaux (chômage, précarité, absence de valeurs morales, échec scolaire, criminalité) laissent le sujet livré à lui-même et en proie à la recherche de nouveautés, augmentant ainsi le risque d'apparition de conduites addictives.

2. La dépendance aux opiacés

2.1. Que signifie le terme d'« opiacés » ?

Le terme d'opiacés regroupe un grand nombre de composés : les naturels, extraits de l'opium (fleur du pavot, *Papaver somniferum*), les synthétiques ou d'autres qui ont des propriétés pharmacologiques comparables mais des structures chimiques très différentes (Reynaud, 2006).

Selon la définition chimique, l'appellation « opiacé » est définie par la structure chimique homogène pour un certain nombre d'entre eux, et dont la structure de base est le noyau morphinane. Plusieurs molécules partagent cette structure de base (morphine, codéine, héroïne...) et constituent la famille des « opiacés naturels », soulignant la différence avec les « opiacés synthétiques » ne présentant pas dans leur structure ce noyau morphinane

(méthadone, buprénorphine...) et rendus alors indétectables par les méthodes immunohistochimiques de recherche urinaire des opiacés.

Selon la définition pharmacologique, la classification des opiacés est réalisée en fonction de leur action sur les différents récepteurs aux opiacés et distingue plusieurs groupes de molécules opiacées : les agonistes (morphine, méthadone, codéine), les agonistes partiels (buprénorphine) et les antagonistes (naloxone, naltrexone).

De manière générale, on parlera d'opiacés pour les substances dérivées de l'opium. Ces produits sont donc d'origine naturelle et on préférera le terme d'opioïde pour définir toute substance, naturelle ou synthétique, se liant à un récepteur aux opiacés (Tableau 3).

Origine des composés	Propriété	Activité
Naturels	Agonistes purs	Forte
• morphine	• morphine	• morphine
• codéine	• fentanyl	• fentanyl
• thébaine	• hydromorphone	• hydromorphone
• noscapine		• oxycodone
	Agonistes partiels	• méthadone
Semi-synthétiques	• buprénorphine	
• dérivés de la thébaine	Agonistes-antagonistes	Intermédiaire
• oxycodone	• pentazocine	• buprénorphine
	• nalbuphine	• nalbuphine
Synthétiques	Activité mixte	Faible
• benzomorphanes (pentazocine)	• péthidine (mépéridine)	• codéine
• phénylpipéridines (fentanyl et congénères, péthidine ou mépéridine)	• tramadol	• dextropropoxyphène
• diphénylpropylamine (méthadone)		• tramadol

Tableau 3 : Classification des opioïdes selon leur origine, leur propriété et leur activité (d'après Beaulieu & Lambert, 2010).

2.2. Les récepteurs opioïdes

Les récepteurs opioïdes appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept hélices transmembranaires (7HTM) couplés aux protéines G (RCPG). Les RCPG sont d'une importance physiologique fondamentale, médiant les actions de la plupart des neurotransmetteurs et des hormones connus (McDonald & Lambert, 2005).

Ils sont couplés à des protéines Gi donc l'activation de ces récepteurs, par des peptides opioïdes endogènes ou exogènes (dont les substances psychoactives à potentiel addictif), inhibe l'adénylate cyclase, diminuant ainsi le taux d'AMPc intracellulaire (Figure 10).

Ceci permet l'ouverture de canaux potassiques (efflux de K⁺), qui entraîne une hyperpolarisation cellulaire au niveau post-synaptique et la fermeture de canaux calciques

voltage-dépendants (pas de sortie de Ca^{2+}), réduisant alors la libération de neurotransmetteurs au niveau pré-synaptique. L'ensemble de ces mécanismes produit une réduction de l'excitabilité neuronale.

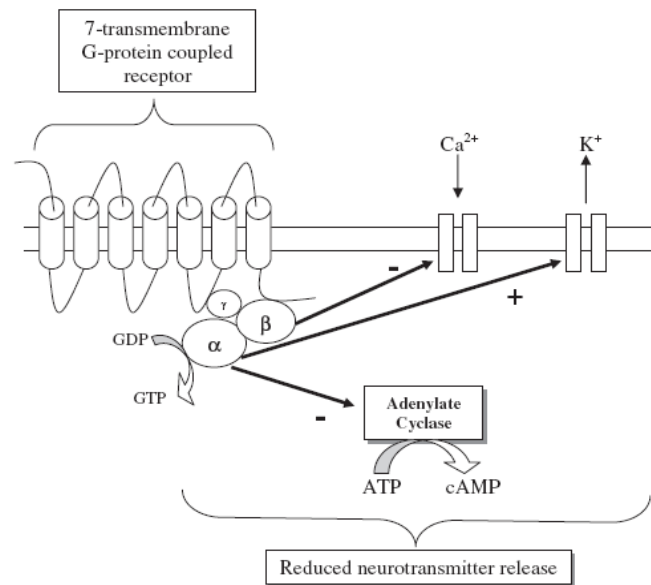


Figure 10 : Récepteur à 7THM couplé à une protéine Gi (d'après McDonald & Lambert, 2005).

On dénombre trois types de récepteurs opioïdes, désignés respectivement par des lettres grecques : les récepteurs μ (mu ou MOP, *mu opioïd peptide*), κ (kappa ou KOP, *kappa opioïd peptide*) et δ (delta ou DOP, *delta opioïd peptide*), dont chacun a son propre répertoire de ligands. Pour chacun de ces trois types de récepteurs, il a été démontré l'existence de plusieurs sous-types ($\mu 1$, $\mu 2$...) provenant de l'épissage alternatif des trois gènes codant pour les récepteurs μ , κ et δ .

Un quatrième type de récepteur opioïde, ORL1 (*opioïd receptor-like 1*) ou NOP (*nociceptin opioïd peptide*) a été identifié plus récemment, mais malgré son homologie avec les trois autres types de récepteurs, il n'est activé que par très peu de ligands (Waldhoer *et al.*, 2004).

Les récepteurs μ , κ et δ sont très largement exprimés dans l'ensemble du système nerveux central, ce qui témoigne de l'implication du système opioïde dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, notamment sensorielles, émotionnelles et cognitives.

Les récepteurs μ sont surtout exprimés dans le thalamus, le striatum, l'amygdale, le locus coeruleus et le noyau du tractus solitaire.

Les récepteurs δ sont principalement retrouvés dans le cortex, le striatum, l'amygdale et les tubercules olfactifs. Les récepteurs κ sont plutôt présents dans le noyau accumbens, l'amygdale, l'hypothalamus, la substance noire, l'ATV et le noyau du tractus solitaire médian. Consécutivement à l'activation des récepteurs opioïdes, différents effets biologiques seront observés (Tableau 4).

Effets des opioïdes	μ	δ	κ
Analgesie			
• supraspinale	+++	–	–
• spinale	++	++	+
• périphérique	++	–	++
Dépression respiratoire	+++	++	–
Constriction pupillaire	++	–	+
Motilité gastro-intestinale réduite	++	++	+
Euphorie	+++	–	–
Dysphorie	–	–	+++
Sédation	++	–	++
Dépendance physique	+++	–	+

Tableau 4 : Effets biologiques principaux des opioïdes en fonction de leur affinité (faible + ; modérée ++ ; forte +++, aucune -) pour les différents types de récepteurs μ , δ , κ (d'après Beaulieu & Lambert, 2010).

2.3. Les peptides opioïdes endogènes

Les peptides opioïdes endogènes sont synthétisés par les neurones et stockés dans des vésicules synaptiques, en attendant d'être libérés (Maldonado, 2010). Ils possèdent quatre acides aminés en communs au niveau de l'extrémité N-terminale et dérivent tous de peptides précurseurs (plus gros), par clivage enzymatique (Figure 11) :

- Peptides dérivés de la Pro-opio-mélano-cortine (POMC)
- Pro-enképhalines
- Pro-dynorphines

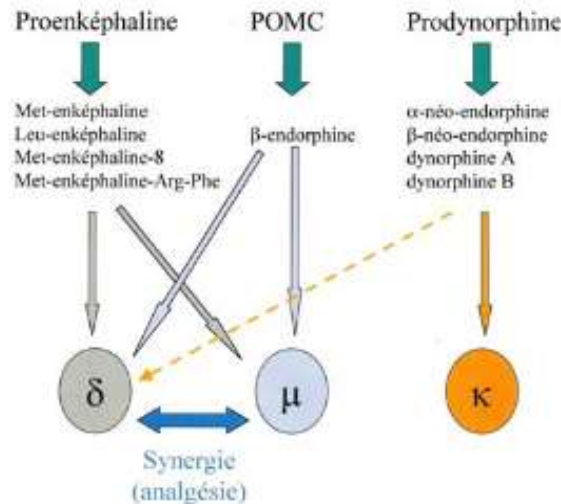


Figure 11 : Peptides opioïdes endogènes et leur action sur les différents types de récepteurs opioïdes μ , δ , κ (d'après Monassier, 2005).

La pro-enképhaline et la pro-dynorphine sont spécifiques des opiacés alors que la pro-opiomélanocortine (POMC) est aussi le précurseur de la MSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*), de la lipotropine ou LPH (*Lipotrophine Hormone*) et de la corticotrophine ou ACTH (*Adreno-Cortico-Trophic Hormone*) (Shimizu *et al.*, 2007).

La libération de dopamine est contrôlée en amont du noyau accumbens, au niveau de l'ATV ou de neurones d'autres structures limbiques. Ce sont les neuropeptides à enképhaline, à endorphine et à dynorphine qui sont à l'origine de cette régulation. Leurs effets sont dits effets neuromodulateurs.

Lorsque la molécule de bêta-endorphine ou de met-enképhaline vient se fixer sur le récepteur opioïde μ du neurone inhibiteur GABAergique, neurotransmetteur qui a pour rôle de diminuer la quantité de dopamine relâchée dans le noyau accubens, elle agit sur ce dernier en freinant son action. Il y a donc une diminution de la production de GABA (acide γ -aminobutyrique) et donc une inhibition de l'effet inhibiteur du GABA sur le neurone dopaminergique, qui va alors produire beaucoup de dopamine, et cela va générer une intense sensation de bien-être (Figure 12).

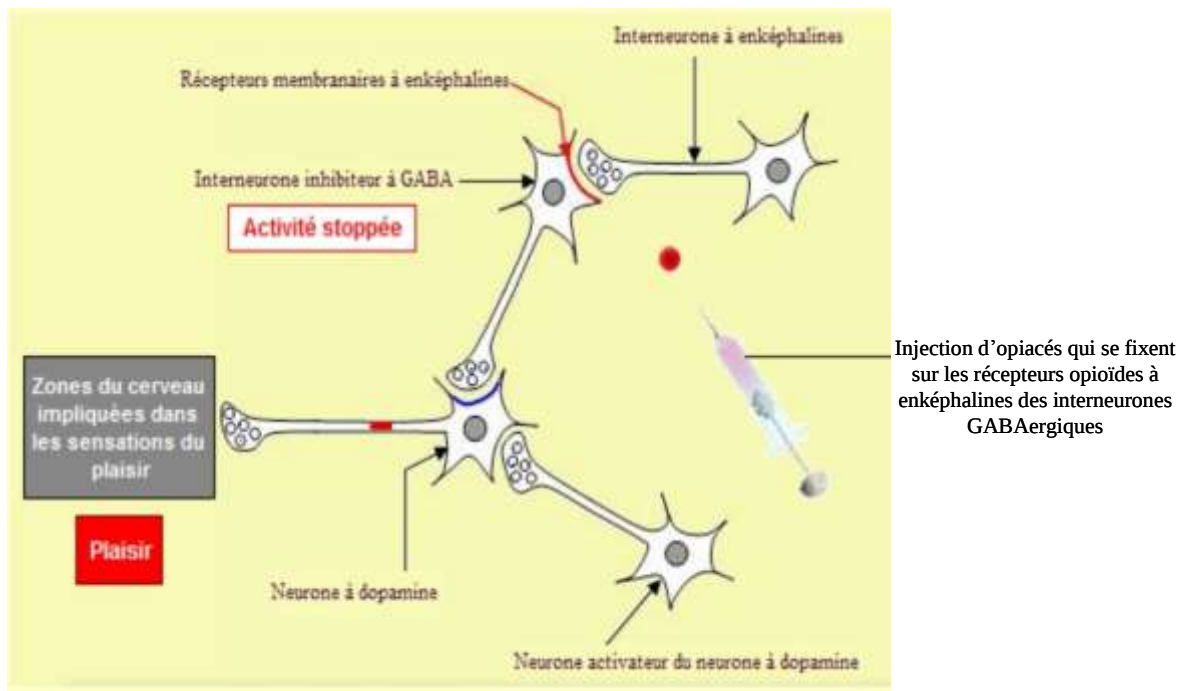


Figure 12 : Effets des peptides opioïdes endogènes et des opiacés sur le système de récompense (d'après <http://tpe-addiction-au-sport.e-monsite.com/pages/l-addiction.html>).

Les enképhalines et les endorphines sont donc associées au plaisir et à l'euphorie. *A contrario*, les dynorphines sont anxiogènes, elles inhibent la libération de dopamine en se fixant sur les récepteurs opioïdes κ et sont donc associées à la vigilance, l'anxiété voire la dépression.

2.4. Diversification des consommations d'opiacés

2.4.1. L'héroïne

La dépendance aux opiacés est un problème qui existe actuellement dans la plupart des pays. La consommation d'héroïne est devenue de plus en plus courante en Amérique du Nord depuis les années 1960 et en Europe depuis les années 1970. Des rapports de l'Office contre la drogue et le crime des Nations Unies (UNODC) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont montré qu'il y avait eu une augmentation globale dans la production, le transport et la consommation d'opiacés, principalement d'héroïne. En effet, la production mondiale d'héroïne a doublé, voire triplé depuis 1985.

Actuellement, la consommation mondiale d'héroïne (340 tonnes) ainsi que les saisies représentent un flux annuel de 430 à 450 tonnes d'héroïne sur le marché international (Figure 13).

L'Afghanistan domine la production de l'opium depuis plus de dix ans et alimente un marché international, vers des destinations clés comme l'Europe Occidentale, la Russie ou l'Asie centrale, représentant près de 2/3 de l'acheminement de la production afghane.



Figure 13 : Production d'opium et trafic d'héroïne dans le monde entre 2002 et 2008 (d'après UNODC, The globalisation of crime, 2010, <http://www.unodc.org>).

Cependant, des données issues de sondages nationaux et d'autres sources laissent entendre que la prévalence de la consommation d'héroïne dans la population générale est relativement faible. Le rapport « Drogues, chiffres clés 2012 » de l'OFDT estime à 13,5 millions le nombre de personnes qui consomment des opiacés dans le monde, dont 9,2 millions consomment de l'héroïne.

Comme pour les autres drogues illicites, l'expérimentation de l'héroïne dans la population adulte concerne surtout les personnes âgées de moins de 45 ans. Il ressort que 1,3 % des hommes et 0,4 % des femmes de 18-64 ans, tandis que 1,3 % des garçons et 0,8 % des filles de 17-18 ans en ont consommé au moins une fois dans leur vie.

2.4.2. Autres opiacés consommés

Les opiacés occupent une place importante dans les consommations de substances psychoactives. Contrairement à la situation des années 1980, l'héroïne ne constitue plus le produit le plus consommé. Suite à la diffusion des traitements de substitution dans les années 1990, le détournement d'opiacés médicamenteux, comme la buprénorphine et la méthadone, a explosé, comme le montre le Tableau 5. Leur plus grande disponibilité sur le marché est lié à

la quantité de prescriptions et à leur accès plus aisé. La buprénorphine est le médicament le plus accessible, la méthadone l'est proportionnellement moins, en raison de sa dispensation plus contrôlée et de son mode d'administration plus difficilement détournable. L'accès au sulfate de morphine est limité, du fait de sa prescription restreinte.

	CAARUD ¹ Mois précédant l'enquête 2010	CSAPA ² Semaine précédant l'enquête 2011
Héroïne	31,3	10,0
BHD	39,5	26,0
Méthadone	28,1	59,0
Sulfate de morphine	14,9	-
Codéine	5,4	-

Tableau 5 : Fréquence (en %) de l'usage d'opiacés parmi les usagers des structures socio-sanitaires en 2010-2011 (d'après l'enquête OFDT-2010¹, <http://www.ofdt.fr/> et l'enquête OPPIDUM-2011², <http://www.addictovigilance.fr/OPPIDUM>). CAARUD : Centre d'accueil et d'accompagnement à la réduction des risques, CSAPA : Centre de soins, d'accompagnement et de prévention en addictologie.

2.4.3. Risques associés

La consommation d'opiacés provoque des problèmes sanitaires et sociaux considérables dans de nombreux pays. En Europe, les sujets qui consomment régulièrement par voie intraveineuse de grandes quantités d'opiacés, présentent un risque de décès de 20 à 30 fois supérieur par rapport aux non-usagers de produits psychoactifs du même groupe d'âge. Selon l'OMS, les risques pour la santé, y compris celui de la transmission du virus VIH et des hépatites B et C, sont considérables (Mbwambo *et al.*, 2012).

Il faut noter que les opiacés restent les principales substances à l'origine des décès par surdose. Alors que la part de l'héroïne diminue, celle des opiacés médicamenteux (méthadone surtout) est en nette augmentation depuis 2010. Selon le rapport « RECAP 2011 » (Recueil Commun sur les Addictions et les Prises en charge) de l'OFDT, ces substances psychoactives sont responsables de près de 8 surdoses mortelles sur 10 en 2011, contre 4 sur 10 en 2006.

3. Traitement : une prise en charge biopsychosociale

La prise en charge pluridisciplinaire du sujet dépendant est une notion fondamentale dans le traitement des dépendances aux opiacés. Il y a actuellement plusieurs possibilités de traitement disponibles, allant d'une thérapeutique « sans médicament » au traitement assisté

sur le plan pharmacologique, y compris des traitements de maintien et de sevrage. Le traitement de substitution aux opiacés (TSO) est, selon l’OMS, la forme de traitement la plus efficace pour le plus grand nombre de personnes dépendantes aux opiacés.

Néanmoins, l’expérience prouve que, en dépit de l’efficacité des différentes approches pharmacologiques de thérapeutique, une majorité de patients rechutent. Certaines études suggèrent même que pour les personnes souffrant d’addiction, la souffrance est davantage psychologique que physiologique.

Avant toute prescription, il est donc important de réaliser une évaluation globale, c’est-à-dire médicale, psychopathologique et sociale, permettant de comprendre le contexte général de l’addiction, propre à chaque individu, et conduisant à de bien meilleurs résultats en ce qui concerne la prise en charge, le suivi et la persévérance des patients (Assemblée parlementaire, 2007).

3.1. Evaluation globale

Cette évaluation sera réalisée lors d’un premier entretien avec le patient, selon une volonté personnelle de se soigner ou adressé par un professionnel (médecin généraliste, psychiatre).

Il est important de formaliser le diagnostic de dépendance, en se basant sur les critères diagnostiques du DSM-IV et de la CIM. Ce diagnostic ne peut se faire que sur la base d’un entretien médical (pluridisciplinaire) avec le patient, voire même avec l’entourage proche, dans lequel des renseignements cruciaux seront recueillis, notamment :

- sur l’état médical du patient : état sérologique, pathologies/symptômes, antécédents psychiatriques personnels et/ou familiaux par la recherche de comorbidités (dépression, anxiété), polyconsommations...
- sur le contexte de vie : logement, travail, environnement familial (fratrie, statut marital, enfants) et amical, contexte social et judiciaire, existence d’une couverture médicale...
- sur la façon de consommer : voie d’administration, partage de matériel d’injection, fréquence...

Un dosage urinaire d’opiacés sera effectué mais le diagnostic ne doit pas se limiter à la dépendance aux opiacés, il sera donc également recherché d’autres dépendances et d’autres usages de substances susceptibles de donner lieu à une dépendance ou pouvant interagir avec le traitement qui sera mis en place (alcool, benzodiazépines...).

De plus, expliciter et clarifier les objectifs de la prise en charge avec le patient est une étape primordiale, par l'évaluation de la motivation du patient et la mise au point, avec lui, d'une stratégie thérapeutique adéquate. L'implication du patient est importante pour que sa prise en charge permette un changement de comportement en profondeur.

3.2. Qu'est-ce que le TSO ?

Parmi les traitements pharmacologiques, on distingue des traitements de substitution aux opiacés (TSO), consistant en l'utilisation de composés médicamenteux qui imitent certains effets des psychotropes mais sans en avoir les effets néfastes. Ceci dans le but de réduire les comportements de consommation ainsi que les risques de mortalité liés à la qualité des produits, à leur dosage et à la criminalité qui est associée à leur recherche.

Cette alternative thérapeutique est la plus répandue pour le traitement de la dépendance aux opiacés avec l'utilisation de deux médicaments : la méthadone et la buprénorphine.

Ces deux molécules sont les seules à disposer, en France, d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans cette indication et chacune a ses propres modalités de prescriptions (Tableau 6).

	Méthadone	Buprénorphine
Prescripteur	Prescription initiale : tout médecin dans le cadre d'un CSST ou d'un établissement de santé (public ou privé). Relais possible auprès de tout médecin, à la discrétion du prescripteur initial, après stabilisation.	Tout médecin
Statut	Stupéfiant	Liste I, soumis aux conditions de prescription des stupéfiants
Ordonnance	Sécurisée exclusivement, avec mention du pharmacien obligatoire. En cas de relais par le prescripteur initial vers un autre prescripteur, la dernière ordonnance du prescripteur initial doit mentionner le nom du prescripteur qui prend le relais.	Sécurisée exclusivement. Mention du pharmacien utile pour la qualité de la prise en charge.
Libellé	En toutes lettres	En toutes lettres
Durée maximale	14 jours, recommandée 7 jours	28 jours, recommandée 7 jours

Délivrance	7 jours, sauf indications autres, en plus (pour la durée maximale de 14 jours) ou moins (jusqu'à tous les jours, avec prise à la pharmacie).	7 jours, sauf indications autres, en plus (pour la durée maximale de 28 jours) ou moins (jusqu'à tous les jours, avec prise à la pharmacie).
Recommandations cliniques	Une bonne communication entre le prescripteur initial et le prescripteur relais est importante en cas de relais. Dans le cadre de la mise en place du traitement, un dosage urinaire préalable négatif pour la méthadone est réglementaire pour éviter les doubles prescriptions. Les dosages urinaires de suivi sont obligatoires, à la discrétion du prescripteur.	La mention du pharmacien est très utile pour la qualité de la prise en charge. A la mise en place du traitement, la délivrance quotidienne doit être la règle pour le prescripteur non spécialiste. Une délivrance non quotidienne doit être réservée au spécialiste addictologue. Les dosages urinaires, bien que non obligatoires réglementairement, sont très utiles comme aide à l'évaluation conjointe et pour soulager les patients des contraintes liées aux enjeux de « tout dire ».

Tableau 6 : Méthadone et buprénorphine, modalités de prescriptions, contraintes légales et recommandations cliniques (d'après Reynaud, 2006). CSST : Centre Spécialisé de Soins aux Toxicomanes

L'objectif du TSO est clair : permettre aux personnes dépendantes de devenir abstinentes de l'opiacé ayant engendré la dépendance. C'est pourquoi, le TSO impose que les molécules utilisées aient un profil pharmacologique particulier afin d'avoir la meilleure prise en charge possible, d'éviter les détournements et les risques sanitaires: une demi-vie longue, pas d'effet flash, non injectable, peu de tolérance, peu d'effet euphorique à dose thérapeutique, pas de surdose, une sécurité d'emploi, peu d'effets secondaires (Tableau 7) (Gibier, 1999).

	Méthadone	Buprénorphine
Demi-vie longue	oui	oui (sauf injectée)
Effet flash	non	non (sauf injectée)
Injectable	non	oui
Tolérance	non	non
Effet euphorique à dose thérapeutique	oui (à fortes doses)	non
Possibilité de surdose	oui	non

Tableau 7 : Profil pharmacologique de la méthadone et de la buprénorphine (d'après Gibier, 1999)

Les critères d'indications d'un TSO par des agonistes opiacés (méthadone, buprénorphine) sont les suivantes :

- Dépendance majeure et indubitable aux opiacés.
- Demande explicite d'aide par le moyen de la substitution, ou au moins, l'accord du patient.
- Consentement au cadre thérapeutique (par exemple respect des horaires, conditions de la relation thérapeutique).
- Etat de santé compatible avec un maintien ambulatoire.

Ces critères doivent être tous satisfaits. La substitution n'est évidemment qu'un des éléments de la prise en charge des dépendances aux opiacés. Mais c'est le plus souvent l'élément central, celui qui est demandé en priorité par les toxicomanes.

4. La méthadone

La méthadone est un opioïde, synthétisé pour la première fois en 1937 en Allemagne et utilisé à l'origine comme analgésique afin de palier la pénurie de morphine, lors des interventions chirurgicales en tant de guerre, et présentant un potentiel d'addiction plus faible.

4.1. Généralités

4.1.1. Bases structurales

La molécule de méthadone possède un centre chiral (Figure 14) et se présente donc sous forme de deux énantiomères : la (R)-méthadone et la (S)-méthadone, différenciables par leur pouvoir rotatoire opposé (Figure 15).

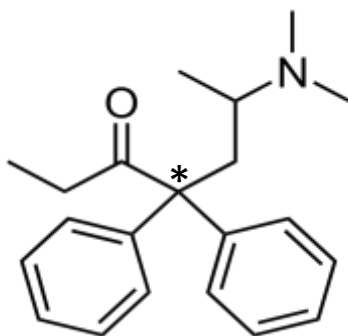


Figure 14 : Structure chimique de la méthadone, avec présence d'un carbone asymétrique (*)

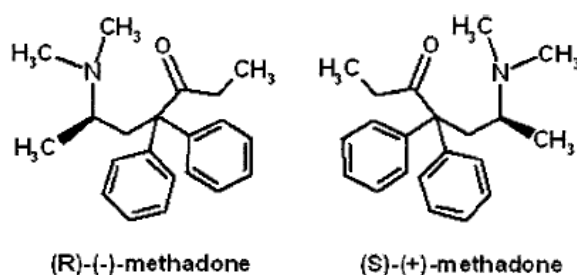


Figure 15 : Enantiomères R et S de la méthadone (d'après Gerber et al., 2004)

La forme racémique, c'est-à-dire le mélange 50:50 des deux énantiomères, est celle utilisée en thérapeutique, généralement sous forme de chlorhydrate de méthadone. Cependant, les deux énantiomères ont des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques différentes. L'effet pharmacologique de la méthadone est exercé principalement par la (R)-méthadone, en raison de sa stéréosélectivité vis-à-vis des récepteurs μ (Isbell & Eisenman, 1948 ; Scott *et al.*, 1948 ; Kristensen *et al.*, 1995). La (S)-methadone est, quant à elle, responsable d'une toxicité cardiaque (Ansermot *et al.*, 2010).

4.1.2. Indication et mode d'action

La méthadone est indiquée dans le traitement substitutif des pharmacodépendances majeures aux opiacés depuis les années 1960 mais son utilisation légale en France ne date que de 1995. La méthadone est un agoniste puissant des récepteurs aux opiacés qui agit principalement sur ceux de type μ . La liaison méthadone-récepteur est rapide et intense mais de durée relativement limitée.

4.1.3. Effets secondaires et contre-indications

Selon le RCP (Résumé des caractéristiques du produit) de la méthadone, il existe certaines contre-indications empêchant son utilisation :

- âge inférieur à 15 ans.
- insuffisance respiratoire grave.
- hypersensibilité à la méthadone.
- traitement concomitant par un agoniste partiel (buprénorphine), par un agoniste-antagoniste morphinique (pentazocine, nalbuphine), par un antagoniste morphinique (naltrexone) ou par sultopride.

Chez le sujet pharmacodépendant aux opiacés, lors de la mise en place du traitement par la méthadone, les patients ressentent généralement des effets sédatifs et d'autres effets, propres aux opioïdes (nausées, vomissements, constipation, bouche sèche, myosis). Une tolérance à la plupart de ces effets se développe au fur et à mesure du traitement et après que la dose ait été correctement équilibrée. Lors de la phase d'entretien, les effets indésirables les plus fréquents sont l'hypersudation, les nausées, la constipation, la prise de poids (œdème), la dysurie. D'autres effets (maux de tête, insomnie, urticaire) sont parfois décrits.

Dans certains cas très rares de surdose, de traitements concomitants ou bien d'une sensibilité individuelle, des effets plus sévères peuvent être observés, tels qu'une dépression respiratoire, une bradycardie sévère, une hypotension sévère, voire un arrêt respiratoire ou cardiaque (Bell *et al.*, 2009).

De nombreuses études parfois contradictoires, ont essayé d'établir un lien entre la posologie de méthadone et l'allongement de l'intervalle QT (Peles *et al.*, 2007 ; Stringer *et al.*, 2009 ; Roy *et al.*, 2012). Certains études soutiennent et renforcent les résultats selon lesquels la méthadone à posologie modérée (inférieure à 100 mg/jour) n'est pas associée à une augmentation significative de l'intervalle QT et mettent en lumière que la toxicité cardiaque serait plutôt due à une association entre un allongement de l'intervalle QT et une hypokaliémie (Anchersen *et al.*, 2009). Aujourd'hui, le lien entre le traitement par méthadone et la prolongation de l'intervalle QT est bien établi. De nombreux désaccords persistent cependant à propos d'une éventuelle dose-dépendance de l'allongement de l'intervalle QT. Une influence du temps de traitement, de l'âge et du sexe n'a pas encore été éclaircie. C'est pour cela, qu'en pratique, l'électrocardiogramme (ECG), l'ionogramme et une surveillance accrue de l'intervalle QT font partie des recommandations du traitement par méthadone.

4.1.4. Evolution des formes galéniques

La méthadone se présente sous différentes formes pharmaceutiques :

- forme sirop, commercialisée en premier en 1995, à plusieurs dosages (5mg/3,75ml, 10mg/7,5ml, 20mg/15ml, 40mg/15ml, 60mg/15ml).
- forme gélule, qui a obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2007, à différents dosages (1, 5, 10, 20, 40mg).

Les formes sirop et gélule (ajout d'une substance gélifiante) permettent de gêner considérablement le détournement de la méthadone vers l'injectable.

La forme gélule est cependant réservée, en France, aux patients traités par la forme sirop depuis au moins un an.

4.2. Pharmacocinétique de la méthadone (Reynaud, 2006)

4.2.1. Absorption

Du fait de son caractère liposoluble, la méthadone administrée par voie orale est rapidement absorbée (en 1 à 2 heures) au niveau du tractus gastro-intestinal. Sa biodisponibilité est d'environ 70-80%, mais peut varier de façon inter-individuelle de 35 à 100%.

4.2.2. Distribution dans l'organisme

La méthadone peut être détectée dans le plasma dans les 30 minutes suivant l'administration par voie orale et atteint des concentrations maximales à environ 4 heures. Sa durée d'action est de 6 à 8 heures pour une administration unique mais largement supérieure en cas de prise chronique. Hautement lipophile, la méthadone se lie de façon variable à l'albumine et aux autres protéines plasmatiques et tissulaires (60-90%), ce qui peut expliquer ses effets cumulatifs et sa lente demi-vie d'élimination. Elle se distribue de façon aisée dans de nombreux tissus, notamment dans le foie, qui sert d'organe de réserve et d'où la méthadone est progressivement libérée, maintenant une concentration constante au niveau cérébral. Les concentrations tissulaires en méthadone (foie, poumons, reins, cerveau) sont supérieures à celles retrouvées au niveau plasmatique. La méthadone diffuse également à travers le placenta et est excrétée dans le lait. Lors de l'arrêt de l'administration de méthadone, de faibles concentrations sont maintenues dans le plasma du fait de la libération lente des sites de liaisons extravasculaires, expliquant en partie un syndrome de sevrage relativement « doux » mais prolongé.

Sa demi-vie plasmatique est de 12 à 18 heures (15 en moyenne) après administration orale unique mais de 13 à 47 heures (25 en moyenne) lors d'une administration prolongée, dans le cadre d'un traitement de substitution.

4.2.3. Métabolisme de la méthadone

La méthadone est métabolisée principalement au niveau hépatique où elle subit majoritairement une N-déméthylation puis une cyclisation en EDDP (2-éthylidène-1,5-

diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine) et ensuite en EMDP (2-éthyl-5-méthyl-3,3-diphénylpyrrolidine) (Figure 16).

La méthadone, l'EDDP et l'EMDP, métabolites majeurs de la méthadone, dénués d'activité pharmacologique, subiront une hydroxylation suivie d'une glucurono-conjugaison. La méthadone peut cependant subir directement l'hydroxylation et la glucurono-conjugaison. Elle peut être également métabolisée, de façon minoritaire, par hydroxylation en méthadol, suivie d'une N-déméthylation en norméthadol.

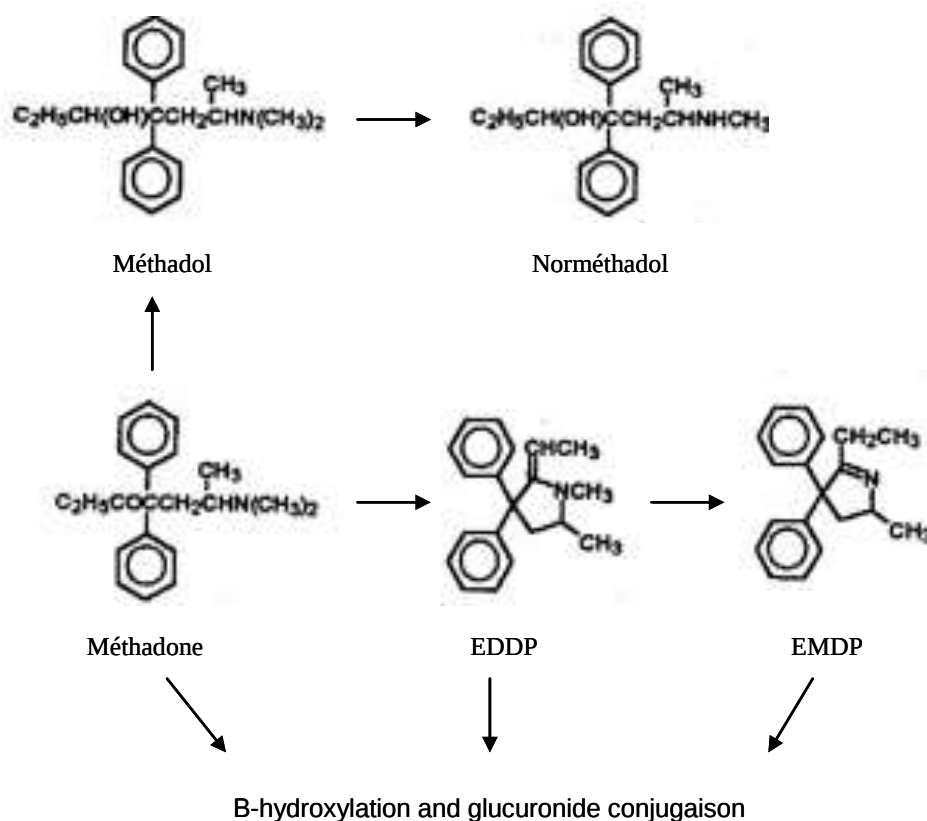


Figure 16 : Métabolisation de la méthadone au niveau hépatique (d'après <http://toxwiki.wikispaces.com/Methadone>).

La métabolisation de la méthadone est attribuée aux cytochromes P450 et notamment au cytochrome 3A4, qui semble être le plus impliqué dans sa dégradation, via la N-déméthylation (Iribarne *et al.*, 1996). D'autres cytochromes, tels que le CYP2D6 et le CYP2B6, jouent également un rôle dans son métabolisme (Ferrari *et al.*, 2004 ; Levran *et al.*, 2013).

D'autres isoenzymes, tels que le CYP1A2, le CYP2C8, le CYP2C9 et le CYP2C19 pourraient aussi être impliqués dans son métabolisme (Wang & DeVane, 2003 ; Gerber *et al.*, 2004 ; Crettol *et al.*, 2005).

4.2.4. Elimination

La méthadone et ses métabolites sont excrétés à des degrés divers dans l'urine et les fèces. A dose thérapeutique, la majorité des métabolites sont éliminés par voie biliaire. De façon minoritaire, la méthadone est excrétée par filtration glomérulaire et subit une réabsorption rénale. La réabsorption de la méthadone diminue à mesure que le pH urinaire diminue.

4.3. Traitement de maintenance par la méthadone (TMM) (Morel, 2006)

4.3.1. Précautions d'admission

L'anamnèse doit permettre d'affirmer la dépendance et d'établir le niveau de consommation (quantité, fréquence, heure de la dernière prise, symptômes éventuels d'imprégnation/de sevrage). Une fois le diagnostic posé, avant même le début du traitement, une alliance thérapeutique doit être réalisée entre le patient et le soignant, afin de clarifier les objectifs du traitement par méthadone.

4.3.2. Induction et dose de sécurité

L'induction d'un traitement de substitution par méthadone, c'est-à-dire la première prescription, requiert une rigueur spéciale. Un dépistage urinaire des drogues doit être réalisé avant toute administration de méthadone. Quel que soit le patient, il est fortement recommandé de commencer en respectant un dosage maximal de sécurité : 30-40 mg de méthadone, pour la première prise, selon le niveau de dépendance physique. Il convient de s'en expliquer auprès du patient, comme prévention des accidents de surdosage. En effet, des études ont montré un risque significatif de surdosage fatal dans les 78 premières heures d'un traitement par méthadone si le dosage de départ dépassait les 40 mg par prise (Drummer et al., 1992). Cette première dose doit être administrée au moins 10 heures après la dernière prise d'opiacés et il convient de revoir le patient dans les 12 à 24 heures pour ajuster le dosage, en progressant par palier de 5-10 mg à intervalles courts selon les besoins, jusqu'à atteindre la dose de stabilisation.

4.3.3. Phase de maintenance

La phase de maintenance d'un TSO requiert, de la part du prescripteur (addictologue), de procéder à un ajustement du dosage, destiné à être ensuite maintenu aussi longtemps que nécessaire mais qui pourra faire l'objet de modulations transitoires, après ré-évaluation

clinique. La dose d'entretien se situe habituellement entre 60 et 100 mg/jour mais des doses supérieures peuvent être nécessaires.

4.3.4. Suivi du TMM

Des analyses urinaires doivent être effectuées au cas par cas pour vérifier le respect du protocole par le sujet et mesurer l'efficacité du traitement sur la prise d'opiacés illicites ou d'autres stupéfiants. Les analyses portent sur : la méthadone, les opiacés naturels, la cocaïne, les dérivés amphétaminiques, le cannabis ainsi que sur les benzodiazépines. La recherche et le dosage des produits listés ne sont pas systématiques mais sont effectués sur demande du prescripteur.

4.3.5. Phase dégressive

Avant d'entamer une phase dégressive de la dose de méthadone, il ne faut pas perdre de vue que ce qui justifie d'entamer cette seconde phase, c'est l'évolution des problématiques sous-jacentes vis-à-vis desquelles la consommation a initialement fait office de solution ou de refuge pour le patient. La phase dégressive correspond à une réduction hebdomadaire de 3 à 10 % de la dose totale de méthadone de départ. Grâce à ces paliers, seuls des symptômes discrets apparaissent et persistent pendant 48 à 72 heures, suivant la diminution des doses (frissons, nervosité). Pendant cette période, il est nécessaire d'être vigilant à toute reprise de l'intoxication qui nécessiterait un retour à la posologie antérieure. Il n'existe pas de dose standard à partir de laquelle le traitement peut être stoppé. En général, plus le traitement a été long, plus l'arrêt doit être progressif, mais d'autres facteurs interviennent, comme la crainte du patient de voir le suivi interrompu. Un rendez-vous programmé 3 à 4 jours après la dernière prise de méthadone permet de réduire les phénomènes anxieux.

Cependant, même après des traitements bien conduits, les rechutes ne sont pas à exclure et la reprise du traitement est d'autant plus importante, le patient se trouvant souvent dans une situation très culpabilisante.

4.4. Variation de l'efficacité du TMM en clinique

La définition d'un patient répondeur ou non répondeur au TMM est difficile à établir. Il y a une grande variabilité inter-individuelle dans les résultats cliniques chez les sujets sous TMM.

En effet, bien que l'efficacité du TMM dans les pharmacodépendances aux opiacés a été bien établie, le lien entre la pharmacocinétique de la méthadone, la dose nécessaire et les résultats cliniques restent controversés (Dole, 1988 ; Hiltunen *et al.*, 1999). Entre 30 et 80% des patients sous TMM sont évalués mauvais répondeurs, lorsque l'observance du TMM et/ou l'utilisation d'opioïdes illicites sont considérés comme principaux critères d'évaluation. Certaines études réalisées chez des Caucasiens révèlent que chez les patients non répondeurs, la dose prescrite était en général plus élevée et les concentrations plasmatiques plus faibles que chez les patients considérés comme répondeurs. Plusieurs facteurs comme, une mauvaise adaptation posologique, une mauvaise observance, un polymorphisme génétique des enzymes de métabolisation ont été proposés comme facteurs contributifs (Fonseca *et al.*, 2011).

D'autres études ont été menées afin d'évaluer la satisfaction des patients suivant un TMM, au sein de centres spécialisés de soins aux toxicomanes (Pérez de los Cobos *et al.*, 2004 ; Pérez de Los Cobos *et al.*, 2005 ; Pérez de los Cobos *et al.*, 2007 ; Connors, 2009). La « satisfaction des patients » est un concept défini comme le résultat subjectif des attentes et des expériences du patient vis-à-vis du système de santé qui le prend en charge. Ce concept a gagné de l'importance depuis de nombreuses années et est maintenant reconnu comme un des éléments dans la prise en charge des pharmacodépendances par la méthadone. En dépit de cette reconnaissance, les outils d'évaluation restent limités et le lien avec l'efficacité du traitement assez complexe à déterminer.

Une nouvelle échelle multidimensionnelle a été développée dans les années 2000, pour évaluer la satisfaction des patients sous méthadone : la VSSS-MT (*Verona Service Satisfaction Scale for Methadone Treatment*), contenant quatre sous-échelles et de nombreux items (De los Cobos *et al.*, 2002). Cette échelle permet d'évaluer de façon globale la prise en charge et également d'évaluer le ressenti du patient sur l'équilibre de son traitement, dans le but de déceler une éventuelle non-réponse. Les résultats de ces questionnaires montrent que de façon majoritaire, les patients sont satisfaits de leur traitement mais une minorité se plaint de ne pas ressentir l'équilibre thérapeutique, ceci étant corrélé avec les faibles concentrations plasmatiques de méthadone, retrouvés chez ces mêmes patients (Pérez de Los Cobos *et al.*, 2005).

Un possible lien entre les faibles concentrations plasmatiques de méthadone et le polymorphisme génétique des enzymes de métabolisation pose la question de l'intérêt du génotypage de ces enzymes.

PARTIE II : PHARMACOGENETIQUE DU CYP 2D6

1. Présentation générale des cytochromes P450

1.1. Historique

Les cytochromes P450 (CYP P450) forment une superfamille d'enzymes (mono-oxygénases) impliquées dans le métabolisme oxydatif de molécules très diverses, comprenant aussi bien des xénobiotiques (médicaments, toxiques, pesticides...) que des substances endogènes (hormones stéroïdiennes, acides gras, vitamines...). Les CYP P450 ont été découverts à la suite de l'observation du pic d'absorbance d'un pigment inconnu à 450 nm dans des préparations de foie (Klingenberg, 1958). La nature hémoprotéique du pigment ne sera mise en évidence que quelques années plus tard, il sera dénommé cytochrome « P450 » pour Pigment qui absorbe à cette longueur d'onde (Omura & Sato, 1964).

Les CYP P450 sont retrouvés chez la plupart des êtres vivants et notamment chez l'homme, où ils sont présents dans presque tous les tissus, mais de façon majoritaire dans le foie. Les réactions de biotransformation des xénobiotiques, catalysées par les CYP P450, s'inscrivent dans un processus de détoxification évitant l'accumulation de substances potentiellement toxiques pour l'organisme.

L'expression de chaque cytochrome est influencée par une combinaison de mécanismes et de facteurs, incluant l'âge, le sexe, des polymorphismes génétiques, l'induction par des xénobiotiques, la régulation par les cytokines ou les hormones. L'expression des cytochromes peut aussi être modulée dans les états pathologiques.

1.2. Classification

On pensait initialement que le P450 n'était qu'un simple et unique cytochrome. Il a été établi que cette enzyme pouvait exister sous de multiples formes, chacune possédant des propriétés différentes, dépendant à la fois de leur sélectivité vis-à-vis du substrat et de certaines caractéristiques physicochimiques.

Devant le nombre croissant de cytochromes P450, une nomenclature a été mise en place afin de les classer et d'homogénéiser leurs noms (Nebert *et al.*, 1987). En raison de la grande

diversité des substrats pris en charge et des nombreuses réactions catalysées, les CYP P450 sont classés selon leur séquence primaire, c'est-à-dire leur séquence en acides aminés. Les similitudes en termes d'activité enzymatique et de régulation ne sont pas prises en compte dans cette nomenclature. Ainsi, deux cytochromes P450 appartiennent à la même famille s'ils présentent plus de 40% d'homologie de séquence protéique et ils font partie d'une même sous-famille s'ils présentent au moins 55% d'homologie de séquence protéique. Les protéines ayant moins de 3% de divergence sont classées comme isoformes, c'est-à-dire comme des variants alléliques.

Comme le montre la Figure 17, la nomenclature actuelle symbolise, par le préfixe « CYP », l'appartenance à la superfamille des cytochromes P450, un chiffre arabe désigne la famille, une lettre majuscule définit la sous-famille et enfin un deuxième chiffre arabe désigne l'isoforme.

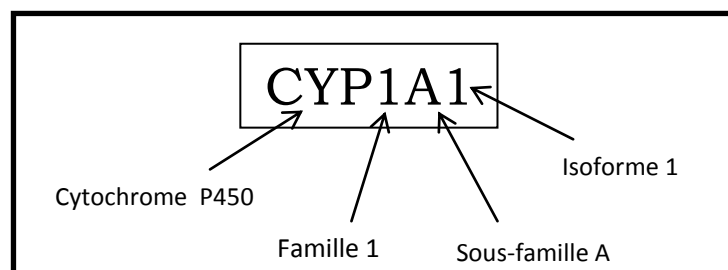


Figure 17 : Classification des cytochromes P450, exemple du CYP1A1

Le gène du cytochrome P450 est représenté en italique. Le produit du gène, ARNm ou protéine, est quant à lui écrit en caractères droits.

On dénombre actuellement 18 familles de cytochromes P450 chez l'homme, dont les formes prépondérantes dans le foie sont représentées dans la Figure 18 (Nelson & Nebert, 2011).

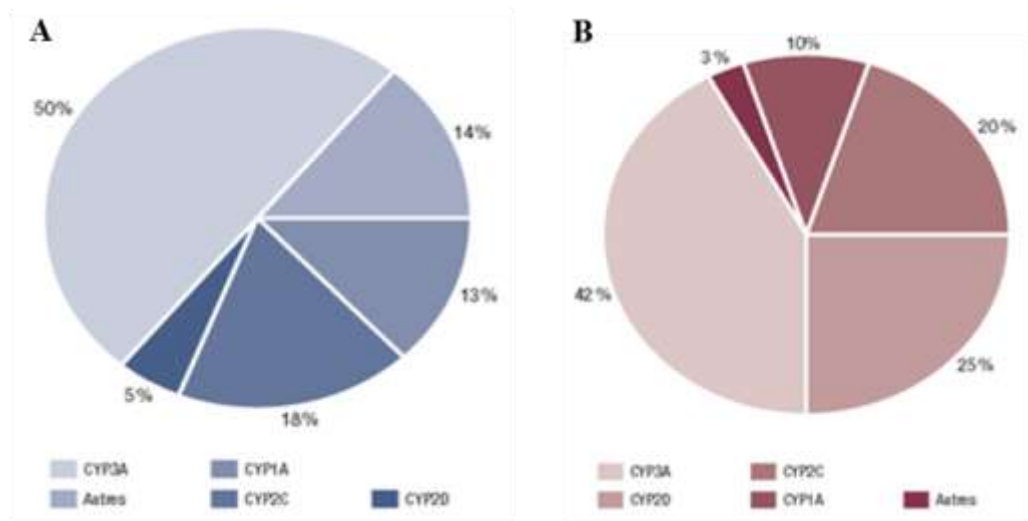


Figure 18 : Proportions relatives (en %) des CYP P450 au niveau hépatique (A) et des médicaments métabolisés par ces CYP P450 (B) (d'après Michaud & Turgeon, 2002).

De 57 cytochromes humains supposés fonctionnels, seulement une douzaine d'enzymes, appartenant aux familles CYP1, 2, et 3, sont responsables de la biotransformation de la plupart des xénobiotiques, dont 70-80% de tous les médicaments utilisés en clinique. Les autres familles de CYP P450 sont plutôt impliquées dans le métabolisme des substances endogènes. Certains cytochromes P450, bien que représentant une proportion faible dans le foie, sont très impliqués dans la métabolisation des médicaments, comme par exemple le CYP2D6.

1.3. Structure et localisation

Les cytochromes P450 sont constitués d'une partie protéique, l'apoprotéine et d'un groupement prosthétique composé d'une protoporphyrine IX liée à un atome de fer (hème) par quatre liaisons covalentes (Figure 19). La cinquième liaison de coordination du fer est réalisée avec le groupement thiolate d'une cystéine conservée et positionnée dans le site catalytique. Enfin, la sixième liaison permet la fixation de diverses molécules comme l'eau et l'oxygène moléculaire. Le spectre d'absorption du CYP P450 à l'état ferrique va dépendre du sixième ligand.

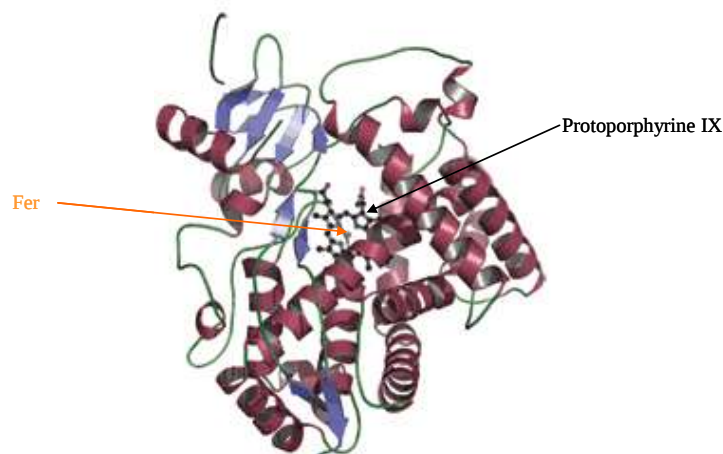


Figure 19 : Représentation tridimensionnelle du CYP P450 2D6 (d'après http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Cytochrome+P-450+Cyp2D6&lang=4)

Les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques chez l'homme sont majoritairement localisés au niveau de la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique des hépatocytes, mais on en trouve également dans d'autres organes, tels que le cerveau, le rein, le poumon, la peau ou le tractus gastro-intestinal (Hoeven & Coon, 1974 ; Zanger *et al.*, 2004). Les quantités relatives et la répartition des cytochromes P450 varient d'un organe à l'autre.

1.1. Cycle réactionnel

Les cytochromes sont associés à des chaînes de transfert d'électrons qui utilisent toutes la NADPH (*Nicotine adenine diphosphonucleotide*) comme source d'électrons.

Les cytochromes du réticulum endoplasmique sont réduits par une protéine membranaire, la NADPH cytochrome P450 réductase (Gu guen *et al.*, 2006). Cette protéine comporte deux domaines, FAD (*Flavin Adenine Dinucleotide*) et FMN (*Flavin MonoNucleotide*), dérivés des flavines (Figure 20).

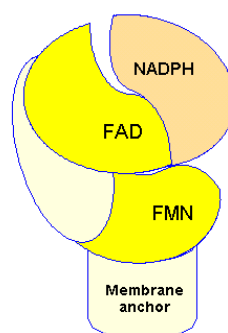


Figure 20 : Structure de la NADPH cytochrome P450 réductase membranaire, composée de deux flavines, le FAD et le FMN (d'après <http://www.cchem.berkeley.edu/clarkgrp/GroupMembersPages/AlumniPages/MattTaylor.html>)

Deux électrons sont ainsi transmis du FAD au FMN puis à l'ion ferrique Fe^{3+} de l'hème du cytochrome. Ces électrons activent le dioxygène dissous pour fonctionnaliser des composés hydrophobes de façon à les rendre plus hydrophiles (Figure 21).

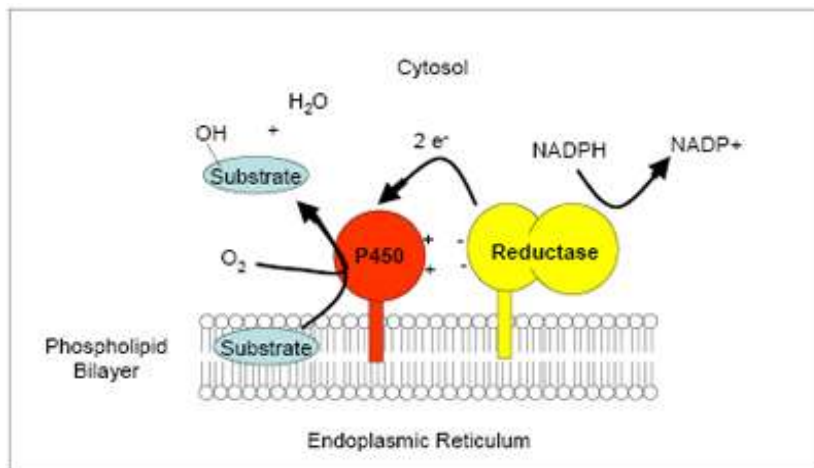
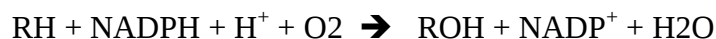


Figure 21: Schéma généralisé du système P450 dans les microsomes hépatiques (d'après <http://www.cchem.berkeley.edu/clarkgrp/GroupMembersPages/AlumniPages/MattTaylor.html>)

Dans la réaction type, le cytochrome P450 transforme un substrat hydrophobe en un produit hydrophile, par l'introduction d'une fonction hydroxyle (OH), afin qu'il soit plus facilement excrété de l'organisme. La réaction type catalysée par ces enzymes peut être résumée comme dans l'équation suivante:



Où RH est le substrat et le R-OH est le produit. Deux protons (H^+) et deux électrons (e^-) sont livrés à partir du cofacteur NADPH par des acides aminés spécifiques.

Le cycle réactionnel des cytochromes P450, représenté sur la Figure 22, peut se résumer de la façon suivante : le substrat se fixe sur le site actif de l'enzyme et prend la place de la molécule d'eau liée à la forme ferrique du fer. Le fer ferrique (Fe^{3+}) est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) par transfert d'un électron de la NADPH réductase sur le fer ferrique. L'oxygène moléculaire se fixe sur la sixième liaison de l'atome de fer. Un électron supplémentaire est alors ajouté et réduit le dioxygène ferreux en complexe activé, capable de réagir avec le substrat. Deux protonations successives sont nécessaires pour libérer une molécule d'eau. Il se produit ensuite un transfert de protons du substrat vers l'oxygène. La réaction se termine par la libération du produit (ROH) du groupement héminique.

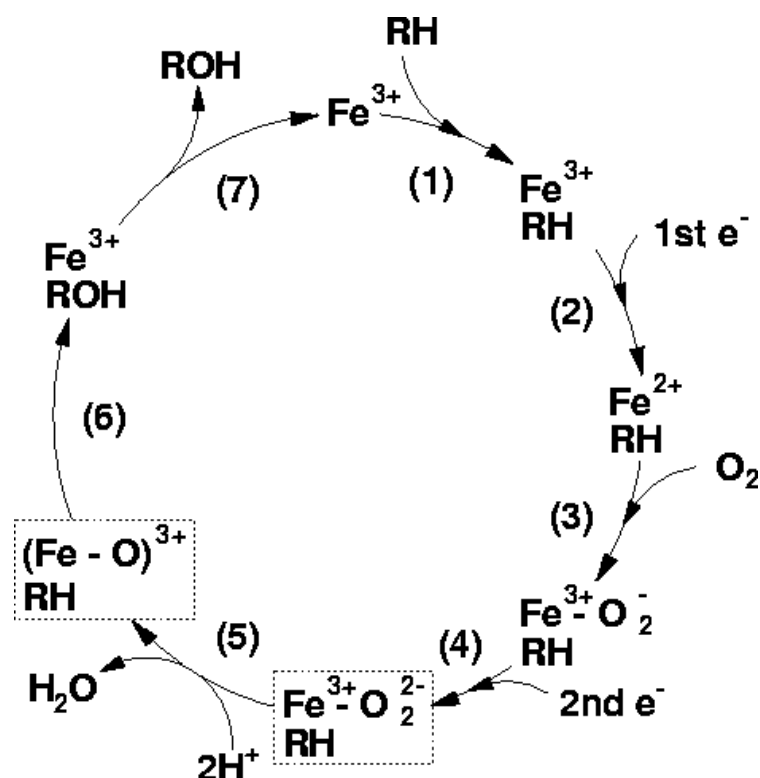


Figure 22: Cycle réactionnel des cytochromes P450 (d'après Segall "The P450 Catalytic Cycle". 1997, <http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node49.html>)

1.2. Rôle dans la détoxification de xénobiotiques

Les organismes vivants sont constamment exposés à une multitude de substances étrangères (ou xénobiotiques) tels que les médicaments, les polluants ou les aliments. Certains xénobiotiques sont des substances hydrophiles, facilement et rapidement éliminées par voie biliaire ou urinaire. D'autres, lipophiles, passent aisément à travers les membranes biologiques et atteignent rapidement leur site d'action, où ils peuvent s'accumuler et entraîner des dysfonctionnements (Beaune, 1998). La biotransformation des xénobiotiques, et notamment des médicaments, implique donc une modification chimique de leurs structures, ceci afin de les rendre plus hydrophiles et donc facilement éliminables ou bien pour neutraliser leurs groupements réactifs potentiellement toxiques pour l'organisme (Brunton *et al.*, 2010).

Le foie est le siège de la majorité de ces réactions de détoxification de l'organisme. La plupart des molécules subissent une double réaction de détoxification (Figure 23).

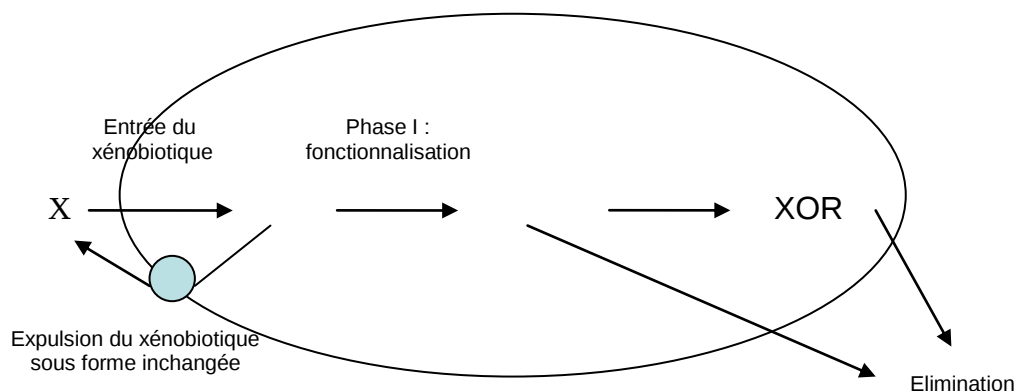


Figure 23 : Schéma général du métabolisme hépatique d'un xénobiotique

Une première étape de fonctionnalisation, dite réaction de phase I, a lieu au niveau des microsomes hépatiques, par des systèmes enzymatiques, où un groupement réactif va être greffé sur le xénobiotique. Cette étape correspond généralement à l'insertion sur le xénobiotique d'un atome d'oxygène par une mono-oxygénase mais d'autres types de réactions enzymatiques sont possibles (réduction, hydrolyse). Les enzymes du cytochrome P450 sont les principales enzymes de phase I du métabolisme chez les mammifères, et sont responsables de la majorité du métabolisme des médicaments (Katzung, 2003).

Les métabolites ainsi formés subissent par la suite une étape de conjugaison, réaction dite de phase II, où une molécule intracellulaire généralement polaire va être greffée au groupement fonctionnel précédent par d'autres enzymes (Glutathion-S-transférase, UDP-glucuronyl-transférase...), et seront éliminés.

Le xénobiotique peut également passer directement en phase II, sans être pris en charge par les enzymes de phase I ou éliminé directement après la phase I (car suffisamment polaire) voire même être expulsé de la cellule hépatique sous forme inchangée par des pompes d'efflux, comme la glycoprotéine P (Pgp).

Pour un médicament, la biotransformation peut influencer son activité pharmacologique de trois façons (Figure 24) : par inactivation, activation ou potentialisation (Alache *et al.*, 1990).

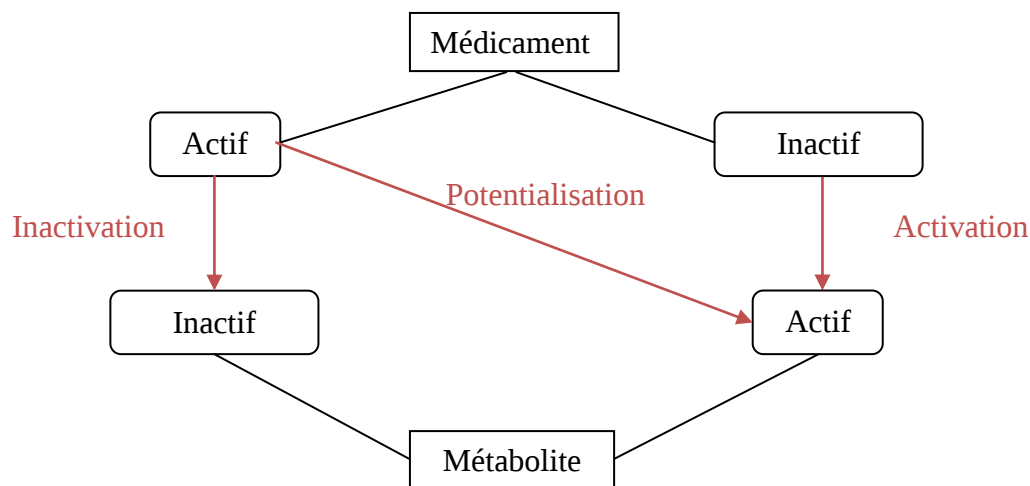


Figure 24: Effet de la biotransformation sur l'activité pharmacologique du médicament (d'après Alache *et al.*, 1990).

2. Etude du CYP 2D6

2.1. Présentation générale du CYP 2D6

2.1.1. Historique

Dans les années 1970, des chercheurs anglais et allemands ont observé que quelques volontaires, participant à des études pharmacocinétiques sur le CYP2D6, avaient souffert d'effets indésirables inattendus. Dans les deux cas, ils ont montré que ces personnes avaient une déficience dans leur capacité à oxyder certaines molécules (débrisoquine et spartéine) et que le défaut métabolique était sous contrôle monogénique (Mahgoub *et al.*, 1977). Plus tard, d'autres médicaments, comme le métoprolol ou le bufuralol, se sont également révélés inefficaces chez d'autres patients (Lennard *et al.*, 1982).

L'élucidation des étapes métaboliques défectueuses et le début des études sur les microsomes hépatiques humains ont suggéré la déficience d'une enzyme spécifique P450, en tant que cause de ces inefficacités thérapeutiques (Dayer *et al.*, 1984). L'enzyme a été purifiée à partir de microsomes hépatiques humains solubilisés et un défaut d'activité catalytique liée à l'absence d'une protéine spécifique de 50kDa a été démontré dans des échantillons de foie d'individus, ne métabolisant pas le bufuralol (Distlerath *et al.*, 1985 ; Zanger *et al.*, 1988).

Suite à ces caractérisations biochimiques, un ADNc humain a été isolé. Il code pour un nouveau membre de la sous-famille CYP2D, qui sera rebaptisé CYP2D6 (Gonzalez *et al.*, 1988).

2.1.2. Structure et locus du gène *CYP2D*

Le locus *CYP2D* humain est situé sur le chromosome 22 dans la région q13.1 et est constitué de trois gènes contigus fortement homologues : *CYP2D8P*, *CYP2D7P*, et *CYP2D6*, situés dans une région d'environ 45 kb (Figure 25) (Kimura *et al.*, 1989 ; Eichelbaum *et al.*, 1987 ; Gough *et al.*, 1993).

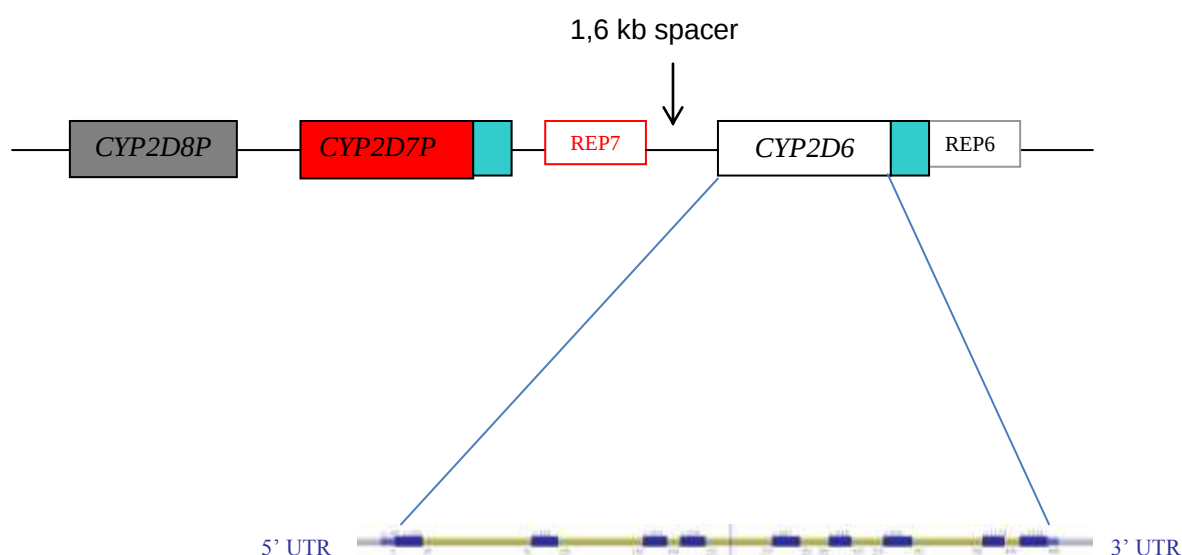


Figure 25 : Structure du locus *CYP2D*, contenant trois gènes contigus *CYP2D6*, *CYP2D7P* et *CYP2D8P*. Les 9 exons du gène *CYP2D6* sont représentés par les carrés bleus foncés et les 8 introns en jaune. Les régions 5' UTR et 3' UTR délimitent le *CYP2D6*.

Le gène *CYP2D6* est composé d'une région longue de 4378 paires de bases, contenant 9 exons, avec un cadre de lecture ouvert de 1491 paires de bases, et 8 introns (Kimura *et al.*, 1989).

Le *CYP2D8P* est un pseudogène non fonctionnel, qui a accumulé plusieurs mutations, dont de multiples suppressions et insertions, et qui n'a pas de cadre ouvert de lecture.

Le *CYP2D7* est exprimé en ARNm dans le foie (Endrizzi *et al.*, 2002). Sa séquence codante ne contient qu'une seule mutation inactivante (insertion d'un T dans le premier exon), ce qui provoque un décalage du cadre de lecture et la terminaison prématurée de la traduction, conduisant à une protéine non fonctionnelle.

Les séquences nucléiques de l'ensemble des exons du *CYP2D7P* et du *CYP2D8P* présentent respectivement 97% et 92% de similarités par rapport à celles du *CYP2D6* (Kimura *et al.*,

1989). Le degré d'identité des trois gènes pour chaque région génique est comparé dans le Tableau 8.

	LENGTH ^a (bp)			% SIMILARITY		
	CYP2D6	CYP2D7	CYP2D8P	CYP 6/7	CYP 7/8P	CYP 6/8P
Upstream	774	777		97		
		186	183		92	
	189		186			89
Exon 1	268	269	265	97	94	93
Intron 1	703	701	1,620 ^b	98	90	89
Exon 2	172	172	172	95	94	91
Intron 2	550	528	546	74	78	77
Exon 3	153	553	153	98	93	92
Intron 3	88	88	88	98	91	93
Exon 4	161	161	161	98	89	91
Intron 4	433	425	449	94	85	86
Exon 5	177	177	177	99	93	92
Intron 5	190	192	186	97	84	83
Exon 6	142	142	142	94	92	96
Intron 6	207	194	204	82	87	90
Exon 7	188	188	185	98	94	95
Intron 7	454	454	449	98	91	91
Exon 8	142	142	142	99	96	96
Intron 8	98	98	96	100	97	97
Exon 9 ^c	252	252		94		
		180	181		95	
	180		181			92
3' Flanking	538	528		97		

NOTE. — Alignments were performed on the Beckman Microgenie® program. Exons or introns that are the same size among genes are underlined.

^a Lengths of upstream and downstream DNAs compared were those of maximal nucleotide similarities. DNA further upstream and downstream did not display significant similarities.

^b Contains a 920-bp insertion.

^c When CYP2D8P exon 9 sequence was compared with CYP2D6 and CYP2D7, alignment finished 1 base after the termination codon.

Tableau 8 : Comparaison des longueurs et du pourcentage de similarité des nucléotides des exons et des introns entre les gènes *CYP2D6*, *CYP2D7P* et *CYP2D8P* (d'après Kimura *et al.*, 1989).

2.1.3. Caractéristiques générales

Le gène *CYP2D6* code pour une chaîne polypeptidique de 497 acides aminés, localisée dans le réticulum endoplasmique (Heim & Meyer, 1992).

La structure cristalline de la protéine *CYP2D6* a été déterminée et donne de nouvelles informations sur le site actif et les exigences chimiques pour la liaison et la catalyse (Rowland *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2012). Les principaux substrats du *CYP2D6* contiennent un azote basique et un cycle aromatique planaire leur permettant de se lier au site actif de l'enzyme (Maréchal *et al.*, 2008).

En effet, la structure de la cavité du site actif du CYP2D6, contenant le groupement héminique, est constituée de nombreux résidus impliqués dans la reconnaissance et la liaison aux substrats, et notamment les résidus Acide Aspartique-301, Acide Glutamique-216, Phenylalanine-483 et Phenylalanine-120 (Figure 26).

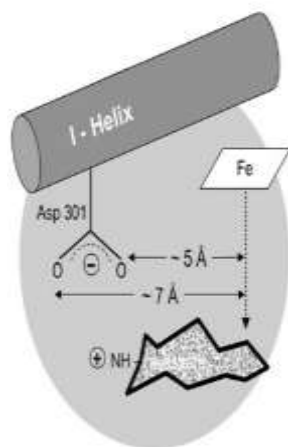


Figure 26 : Représentation schématique de l'interaction entre un substrat azoté et le résidu Asp-301 présent dans le site actif de l'enzyme (d'après Zanger *et al.*, 2004). Asp 301 : Acide Aspartique 301.

2.1.4. Rôles physiologiques

Le nombre de médicaments métabolisés principalement par le CYP2D6 est très grand par rapport à son expression relativement mineure dans le foie (Zanger *et al.*, 2008).

Aujourd'hui, de nombreux substrats ont été identifiés pour le CYP2D6, qui est responsable d'environ 20 à 30% du métabolisme des médicaments utilisés en clinique (Tableau 9). Cette enzyme est également inhibée par de nombreux composés qui n'ont pas besoin d'être des substrats mais qui se lient à elle avec une grande affinité. Outre ces substrats, il est probable que l'enzyme ait un rôle majeur dans le métabolisme des constituants alimentaires, en particulier des alcaloïdes puisqu'elle présente une forte affinité pour ceux-ci. L'expression du CYP2D6, contrairement à d'autres cytochromes hépatiques, ne dépend pas d'agents environnementaux et n'est pas inductible par le tabac, l'alcool, les stéroïdes ou par les hormones (contraceptifs) mais d'autres médicaments sont capables de l'inhiber, provoquant ainsi des interactions médicamenteuses parfois graves (Bock *et al.*, 1994 ; Glaeser *et al.*, 2005).

<i>Major classes of drugs as substrates</i>	Ondansetron
Antidepressants	Otycodone
Tricyclic antidepressants	Perhexiline
Serotonin reuptake inhibitors	Perphenazine
Neuroleptics	Phenacetin
Beta-blockers	Phenformin
Antiarrhythmics	Propafenone
	Propranolol
<i>Specific drugs as substrates</i>	Quinidine
Alprenolol	Risperidone
Amiflamine	Thioridazine
Aprindine	Timolol
Atenolol	Tomoxetine
Bufuralol	Tropisetron
Bupranolol	Zuclopenthixol
Chlorpropamide	
Clomipramine	
Clozapine	<i>Inhibitors, drugs</i>
Codeine	Chinidin
Debrisoquine	Fluoxetine
Desimipramine	Levomopromazine
Desmethylditalopram	Lobelin
Dextromethorphan	Methadone
Dihydrocodeine	Paroxetine
Encainide	Quinidine
Ethylmorphine	Trifluoperidol
Flecainide	
Flunarizine	
Fluperlapine	<i>Inhibitors, alkaloids^a</i>
Guanoxan	Ajmalicine
Haloperidol	Ajmalicine
Hydrocodone	Berberine
Imipramine	Coniine
Indoramin	Ergotamine
Maprotiline	Gramine
Methoxyamphetamine	Hamaline
Methoxyphenamine	Laudanosine
Metamide	Sempervirine
Metoprolol	Vincamine
Mexiletine	Vinblastine
Nortriptyline	

Tableau 9 : Substrats et inhibiteurs du CYP2D6 (d'après Ingelman-Sundberg, 2005)

2.1.5. Phylogénie et évolution des loci *CYP2D*

Le gène *CYP2D6* est conservé chez de nombreuses espèces, et également chez les rongeurs. Certains exons sont cependant plus conservés que d'autres (Figure 27).

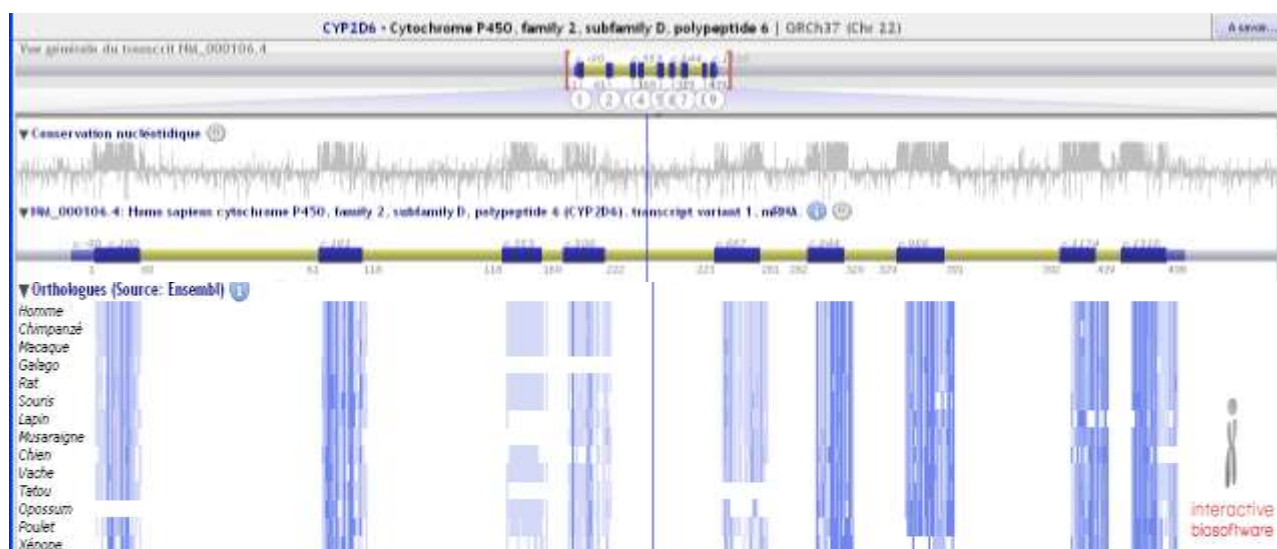


Figure 27 : Conservation inter-espèces des différents exons du gène *CYP2D6* (d'après Alamut Interactive Biosoftware)

Il y a une différence radicale entre les rongeurs et les humains dans le nombre de gènes *CYP2D* actifs. Alors que la souris a neuf gènes *CYP2D* actifs différents, l'homme n'en porte qu'un seul, et qui est, en plus, absent sur un des deux allèles à hauteur de 5% dans la population caucasienne (Figure 28) (Nelson *et al.*, 2004). L'enzyme *CYP2D6* est connue pour avoir une très forte affinité pour les toxines végétales comme les alcaloïdes (Ingelman-Sundberg, 2005). Il est raisonnable de supposer que la souris a conservé plus de gènes actifs, en raison de la nécessité d'un potentiel de désintoxication alimentaire supérieur à celui de l'homme. De plus, une nourriture mieux sélectionnée et plus restreinte est responsable de cette pression de sélection qui a réduit le nombre de gènes actifs chez l'homme.

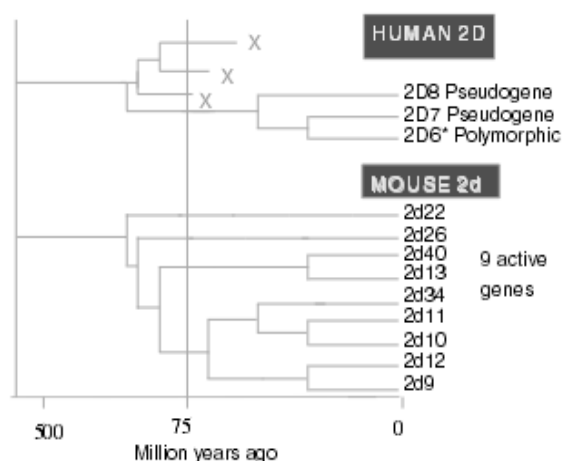


Figure 28 : Evolution des gènes des loci *Cyp2d* chez la souris et des loci *CYP2D* chez l'homme, selon des alignements de séquences (d'après Ingelman-Sundberg, 2005)

La plupart des changements inter- et intra-espèces observés au sein du *CYP2D6* sont essentiellement dus au manque de conservation des introns, aux brassages d'exons, à l'épissage alternatif et aux mutations. Les duplications ont conduit à l'expansion du gène *CYP2D6* et ont favorisé l'apparition de nouvelles mutations indépendantes les unes des autres, en raison de la pression imposée par la sélection naturelle (Gonzalez & Nebert, 1990). Ce processus peut créer différentes isoformes et peut le faire tant qu'une copie du gène dupliqué conserve sa fonction d'origine, l'autre copie pouvant dériver et acquérir des mutations fonctionnelles, bénéfiques ou non pour l'organisme. C'est par l'intermédiaire de ces mécanismes que le *CYP2D6* est devenu l'un des cytochromes P450 les plus polymorphes.

3. Polymorphisme génétique du CYP2D6 et impacts fonctionnels

3.1. Définition d'un polymorphisme génétique

Les polymorphismes chez l'homme ont été détectés initialement à partir des différences inter-individuelles dans les réponses aux médicaments, observées durant les essais cliniques. Rappelons qu'il s'agit de variations alléliques de gènes codant pour des protéines. Un individu peut être homozygote pour un variant (les deux allèles portent le variant) ou hétérozygote (un seul allèle porte le variant).

Les polymorphismes génétiques ne représentent qu'1% du génome mais ils sont essentiels car ils influencent la susceptibilité aux maladies, leur expression clinique et leur évolutivité, mais également la réponse aux médicaments.

Il existe différents types de polymorphismes (Figure 29) (Clement, 2011) :

- Polymorphismes de répétition : ce sont des répétitions en tandem d'une même séquence nucléotidique, encore appelée minisatellite (10-15 nucléotides répétés) ou microsatellite (1-4 nucléotides répétés).
- Polymorphismes ponctuels, ne touchant qu'un seul nucléotide : ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), consistant en des changements de bases d'un seul nucléotide. Les SNPs peuvent se retrouver dans des régions codantes ou non codantes du génome. Les SNPs sont les polymorphismes les plus fréquents, il en existe en moyenne trois millions par génome humain.
- CNVs (*Copy number variations*) : décrits comme une variation structurale de grande taille impliquant des fragments d'ADN (> 1kb) ayant subi un changement dans le nombre de copies. Ils peuvent être sous forme de délétions, d'insertions, de

duplications, de translocations ou bien de variants plus complexes. Ils sont désormais répertoriés dans une base de données disponible sur internet (DGV, *Database of Genomic Variants*).

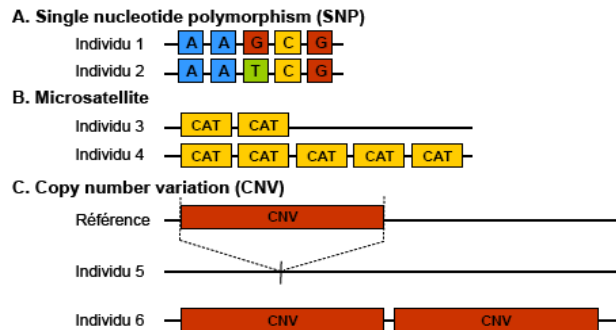


Figure 29 : Trois types de polymorphismes peuvent être responsables de variations individuelles : les SNPs (A), les microsatellites (B) et les CNVs (C) (d'après Clement, 2011)

Même si la majorité des polymorphismes n'entraînent aucun effet sur le phénotype, d'autres prédisposent plus ou moins fortement à des maladies ou interviennent dans les différences inter-individuelles de réponse au traitement ou de métabolisation.

Les polymorphismes génétiques des enzymes, des cibles ou des transporteurs, intervenant dans le métabolisme des médicaments, peuvent expliquer une partie des accidents médicamenteux. Certains variants alléliques sont associés à des gains ou des pertes de fonctions. Outre les polymorphismes génétiques, il existe d'autres causes expliquant ces accidents:

- environnementales : interactions médicamenteuses (inhibition ou induction enzymatique)
- physiopathologiques : âge, pathologies associées

La pharmacogénétique, discipline en essor constant, étudie les relations entre la variabilité du génome et la réponse thérapeutique. Elle a pour but d'optimiser les décisions thérapeutiques en fonction du génome de chaque individu et de la molécule cible, afin d'améliorer la prise en charge par le développement d'une thérapeutique personnalisée, prédictive, plus efficace et moins toxique (Bourel & Ardaillou, 2006 ; Shastry, 2006).

Les polymorphismes du gène *CYP2D6* sont parmi les plus étudiés. Deux raisons justifient leur prise en compte :

- Malgré sa faible expression dans le foie, l'enzyme reconnaît comme substrats de nombreux médicaments.
- La fréquence des différents variants est loin d'être négligeable et varie selon la population concernée.

3.2. Polymorphismes génétiques du CYP2D6

3.2.1. Différents phénotypes observés en clinique

Le phénotype d'un individu, pour une enzyme, est généralement évalué par l'administration d'un « médicament-sonde » par voie orale suivie de la quantification des concentrations de ce médicament et de son métabolite dans le sérum ou l'urine. La détermination du rapport métabolique urinaire, appelé *metabolic ratio* (MR) est la procédure de phénotypage la plus courante. Elle correspond au rapport entre les quantités de médicament inchangé et de métabolite, qui apparaissent dans l'urine dans un certain délai, suite à l'administration orale d'une dose unique du « médicament-sonde ».

Plusieurs substrats du CYP2D6 ont été utilisés pour déterminer la variabilité phénotypique, notamment la débrisoquine (antihypertenseur), le dextrométorphane (antitussif) ou la spartéine (antiarythmique) (Eichelbaum *et al.*, 1975 ; Eiermann *et al.*, 1998 ; Dayer *et al.*, 1989).

Bien que l'utilisation de la débrisoquine et de la spartéine est peu coûteuse et assez efficace dans la détermination des variations phénotypiques pour le CYP2D6, ces médicaments ont été retirés de l'utilisation clinique dans la plupart des pays et ne sont donc pas facilement disponibles sur le marché pour les tests de phénotype (Zhou, 2009).

Le dextrométorphane a donc été proposé comme une alternative sûre et largement disponible pour effectuer les études *in vitro* et *in vivo* de détermination du phénotype (Schmid *et al.*, 1985).

Comme indiqué précédemment, de nombreux médicaments couramment prescrits en clinique sont métabolisés par le CYP2D6 (Tableau 9) et les polymorphismes du gène CYP2D6 peuvent induire des effets cliniquement importants.

L'utilisation des médicaments-sonde a permis de déterminer quatre principaux phénotypes, présentés dans la Figure 30 et classés selon le niveau d'activité enzymatique du CYP2D6 (Osikowska-Evers *et al.*, 1987 ; Sachse *et al.*, 1997) en :

- métaboliseurs lents ou *poor metabolizers* (PM) : qui ont hérités de deux allèles déficitaires du *CYP2D6*. Par conséquent, ces individus métabolisent les médicaments à un rythme sensiblement plus lent. Cela conduit à une accumulation de niveaux élevés de médicaments non métabolisés, à un plus grand risque d'effets indésirables et d'interactions médicamenteuses, et à une efficacité moindre pour les médicaments nécessitant une activation par le *CYP2D6*. Le phénotype PM représente 5 à 10% de la population caucasienne.
- métaboliseurs intermédiaires ou *intermediate metabolizers* (IM) : qui sont hétérozygotes pour un allèle *CYP2D6* déficient ou homozygotes pour un allèle à fonction réduite. Ce phénotype concerne 10 à 20% de la population caucasienne.
- métaboliseurs rapides ou *extensive metabolizers* (EM) : qui ont hérités de deux allèles normaux ou bien qui sont hétérozygotes pour un allèle associé à une fonction enzymatique réduite. Le phénotype EM, qui entraîne une activité normale de l'enzyme, est exprimé par la majorité de la population caucasienne (environ 70-80%). Il s'agit du phénotype sauvage.
- métaboliseurs ultra-rapides ou *ultrarapid metabolizers* (UM) : dus à des duplications ou des multiduplications de gènes *CYP2D6* actifs. Les personnes ayant le phénotype UM portent plusieurs copies du *CYP2D6* sur un même allèle et métabolisent les médicaments à un rythme ultra-rapide, ce qui peut conduire à une perte d'efficacité thérapeutique à des doses standard. Le phénotype UM ne concerne que 1 à 5% de la population caucasienne.

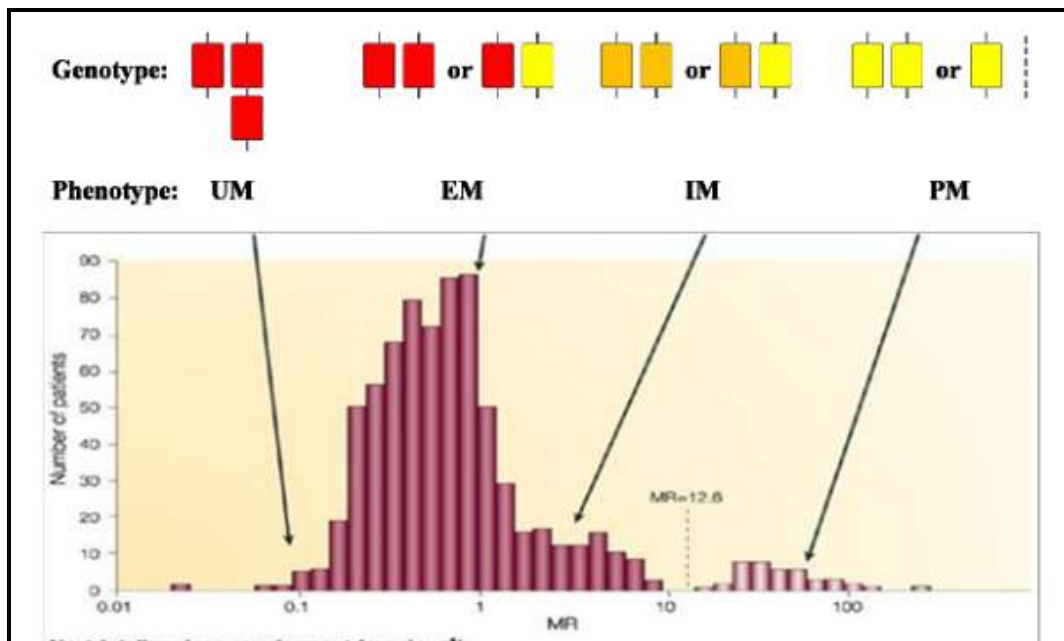


Figure 30 : Présentation des différents phénotypes, associés aux génotypes, et leur distribution dans une population randomisée d'origine européenne (d'après Ramamoorthy, 2010). Les allèles pleinement fonctionnels sont représentés par les rectangles rouges, ceux avec une fonction réduite par les oranges, les non fonctionnels par les jaunes. La délétion d'un allèle est indiquée par un trait en pointillé. Les phénotypes ont été déterminés par le MR de la débrisoquine.

Des études conduites dans différents pays ont démontré des variations inter-ethniques significatives pour les phénotypes, avec des différences notables entre les populations caucasiennes, asiatiques, africaines, et afro-américaines (Ingelman-Sundberg, 2005).

La prévalence des individus PM et UM a été extensivement étudiée puisque ce sont ces deux phénotypes qui ont le plus d'impact au niveau clinique. Le Tableau 10 présente la fréquence de ces deux phénotypes dans des groupes d'origine géographique différente.

Au sein même de la population caucasienne, des différences sont observées. En effet, dans le Nord de l'Europe, on ne trouve que 1-2% d'individus UM tandis que dans le Sud de l'Europe (Espagne, Italie, Turquie), on en dénombre jusqu'à 10%.

Chez les populations africaines, le phénotype UM est beaucoup plus représenté, avec jusqu'à 30% en Ethiopie alors que chez les asiatiques, il est plutôt rare (Aklillu *et al.*, 1996).

Les métaboliseurs PM sont plus rares dans les populations africaines (1 à 3%) et quasi absents chez les asiatiques mais ils sont beaucoup plus représentés en Europe (Abraham & Adithan, 2001 ; Bernard *et al.*, 2006).

Ethnic group	Total subjects	PM (%)	MxN (%)
White North Americans	464	5.8	2.2
Black North Americans	246	3.3	2.4
Germans	589	7.0	2.0
South Germans	195	7.7	1.5
North Spanish	147	5.4	5.1
South Spanish	217	2.8	3.5
Swedish	270	8.0	1.0
Spanish	258	5.0	1.0
French	265	8.4	1.9
Turks	404	1.5	5.8
Koreans	152	0.0	0.3
Chinese	113	0.0	1.3
Nicaraguans	137	3.6	1.1
Saudi Arabians	101	2.0	21
Ethiopians	122	1.8	29

Tableau 10: Fréquences des métaboliseurs lents et des métaboliseurs ultra-rapides dans différentes populations. PM = Métaboliseurs lents, MxN = UM = Métaboliseurs ultra-rapides (d'après Abraham & Adithan, 2001).

3.2.2. Variants alléliques du CYP2D6 et nomenclature

Le CYP2D6 est le cytochrome le mieux étudié et celui dont le polymorphisme génétique montre le plus grand impact, en raison de son large spectre de variants génétiques et de son extraordinaire sélectivité de substrat. Actuellement, 105 allèles distincts et un large nombre de variants alléliques ont été découverts depuis 1989 et sont tous répertoriés dans la base de données <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm> selon une nomenclature précise, introduite en 1996 (Kimura *et al.*, 1989 ; Daly *et al.*, 1996a).

Les allèles qui partagent des « variants clés », à savoir une variation de séquence conduisant à une modification de la fonction de la protéine ou à un changement d'acide aminé sont désignés par le même chiffre (CYP2D6*1 par exemple). Des allèles possédant le même « variant clé » peuvent également se différencier par la présence d'autres variations de séquence, de pertinence fonctionnelle mineure, et sont distingués par des lettres (CYP2D6*1A, *1B...) (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2000 ; Ingelman-Sundberg & Oscarson, 2002).

Les allèles sont répertoriés, sur la base de leur caractère fonctionnel ou non et du niveau d'activité qui en résulte au niveau de la protéine CYP2D6 (Figure 31).

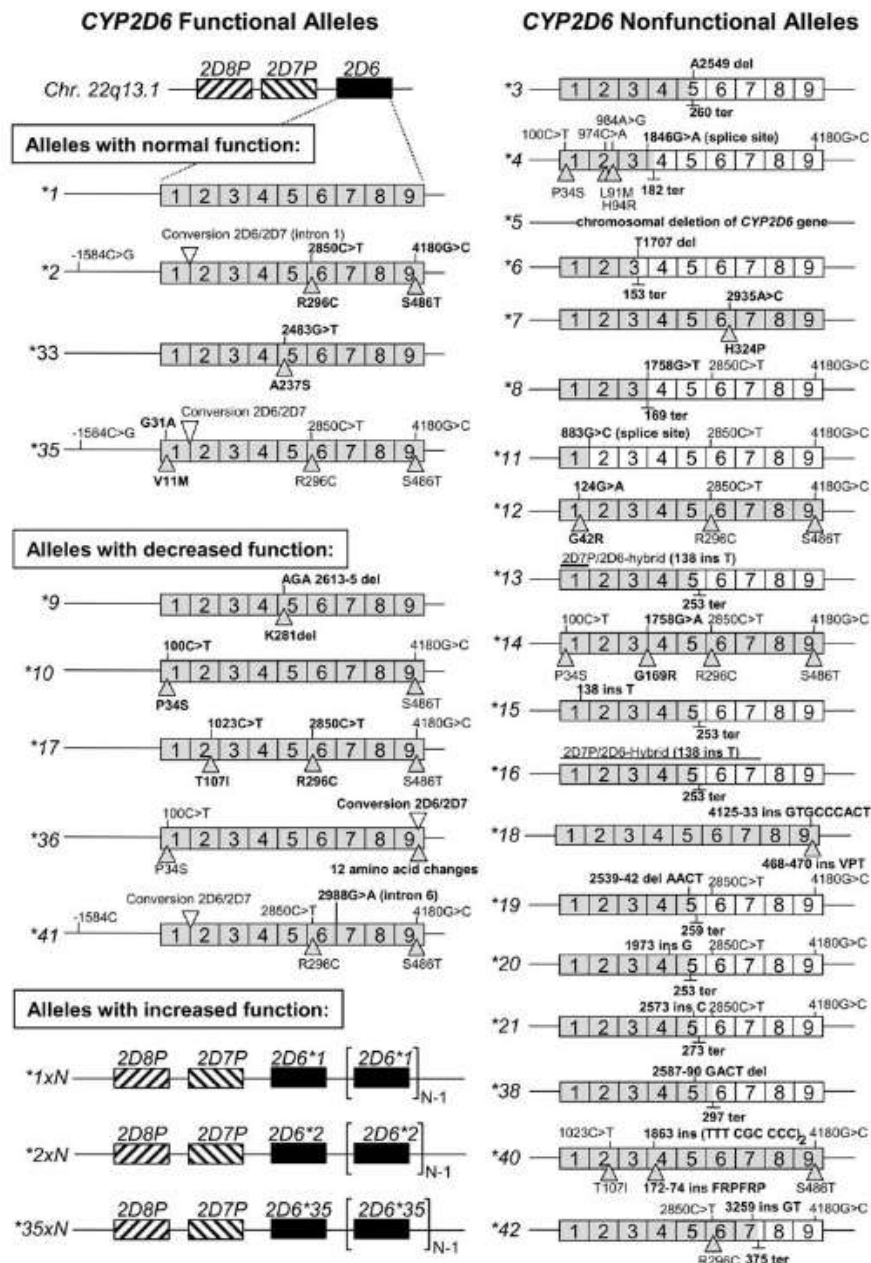


Figure 31 : Structures des allèles fonctionnels et non fonctionnels du CYP2D6 (d'après Zanger *et al.*, 2004). Seuls les allèles avec un phénotype déterminé sont présentés. Les 9 exons sont indiqués dans les cases par les chiffres 1 à 9. Les polymorphismes connus sont indiqués au dessus des exons concernés et les changements d'acides aminés en dessous. Les cadres de lecture ouverts sont représentés par les cases grisées. Les mutations silencieuses et les polymorphismes introniques ne sont pas représentés.

3.2.3. Allèles fonctionnels

3.2.3.1. Allèles associés à une fonction enzymatique normale

Les allèles *CYP2D6**1 et *2 sont les plus fréquents dans la population générale. L'allèle *CYP2D6**1 constitue l'allèle de référence, appelé allèle sauvage ou *wild-type*, c'est-à-dire le plus fréquent dans la population générale et qui confère une activité normale de l'enzyme *in vivo*, entraînant un métabolisme rapide (EM) (Kimura *et al.*, 1989).

L'allèle *CYP2D6**33 conduit également à la production d'une protéine avec une fonction normale.

Initialement classé parmi les allèles associés à une fonction enzymatique normale, l'allèle *CYP2D6**35 donne lieu à des discussions quant au niveau d'activité enzymatique qu'il entraîne. Certaines études le classeraient plutôt parmi les allèles entraînant une fonction enzymatique accrue (Løvlie *et al.*, 2001).

3.2.3.2. Allèles associés à une fonction enzymatique réduite

Les allèles *CYP2D6**9 et *10 sont les plus représentés dans la population caucasienne, avec des fréquences respectives d'environ 1-2% et de 2% (Tyndale *et al.*, 1991 ; Broly & Meyer, 1993).

Dans les populations orientales, la fréquence du *CYP2D6**10 est bien supérieure puisqu'elle dépasse les 50%. L'allèle *CYP2D6**17 est, quant à lui, pratiquement absent de la population caucasienne, alors que dans les populations africaines ou afro-américaine, il est retrouvé à une fréquence d'environ 30% (Oscarson *et al.*, 1997 ; Griesse *et al.*, 1998).

Depuis, d'autres allèles ont été identifiés, comme le *CYP2D6**41 (environ 8% dans la totalité de la population) et le *CYP2D6**69 (Cesaro *et al.*, 2003 ; Gaedigk *et al.*, 2009).

3.2.3.3. Allèles associés à une fonction enzymatique accrue

La caractérisation moléculaire du locus du *CYP2D6* chez les patients présentant un métabolisme ultra-rapide de la nortriptyline a permis de découvrir des allèles composés de multiples copies du *CYP2D6* actif (Bertilsson *et al.*, 1993 ; Johansson *et al.*, 1993 ; Lundqvist *et al.*, 1999). De plus, un niveau significativement élevé de protéines *CYP2D6* et une forte activité enzymatique ont été décrits, après biopsie du foie d'une personne UM (Zanger *et al.*, 2001).

Les duplications ont été identifiées pour la toute première fois sur l'allèle *CYP2D6**2 (Bertilsson *et al.*, 1993 ; Johansson *et al.*, 1993). Par la suite, il a été découvert que ces duplications se produisaient également sur d'autres allèles, tels que sur le *CYP2D6**1 (Schaeffeler *et al.*, 2003).

Comme le montre Tableau 11, quel que soit l'origine géographique, les duplications se produisent majoritairement sur les allèles *2 et *1, même s'il existe une différence très marquée dans le nombre de copies du gène en fonction des ethnies (de 2 à 13 copies).

Allele	Allele frequency (‰)			
	Swedes ^a	Germans ^b	Spaniards ^c	Ethiopians ^d
<i>CYP2D6</i> *1 × 2	0	0.5	ND	ND
<i>CYP2D6</i> *2 × 2	1.5	1.3	3.5–5	13
<i>CYP2D6</i> *2 × 3	0.2	0	ND	1.6
<i>CYP2D6</i> *2 × 4	0	0	ND	0.8
<i>CYP2D6</i> *2 × 5	0	0	ND	0.4
<i>CYP2D6</i> *2 × 13	0.1	0	ND	0

Tableau 11 : Fréquence des allèles portant des gènes CYP626 actifs dupliqués ou multidupliqués, comparée chez des suédois, des allemands, des espagnols et des éthiopiens (d'après Ingelman-Sundberg, 1999)

De plus, le séquençage de la région promotrice du *CYP2D6* (exon 1 et intron 1) a montré que, parmi des sujets UM dépourvus de duplications, deux variants étaient sur-représentés : le c.31G>A (Val11Met) dans l'exon 1, présent uniquement dans l'allèle *CYP2D6**35 et le variant c.-1584C>G au niveau du promoteur (Løvlie *et al.*, 2001). Même si l'allèle *35 a été initialement classé dans les allèles associés à une fonction enzymatique normale, il semble que même non dupliqué, cet allèle entraînerait une fonction enzymatique accrue.

3.2.4. Allèles non fonctionnels

Les allèles non fonctionnels ou « allèles nuls » codent pour une protéine non-fonctionnelle, c'est-à-dire pour un *CYP2D6* sans aucune activité enzymatique résiduelle détectable et sont donc responsables d'un métabolisme lent (PM). Différents mécanismes ont été trouvés pour expliquer la perte totale de la fonction catalytique :

- des mutations ou des petites insertions / délétions qui interrompent le cadre ouvert de lecture ou qui interfèrent avec l'épissage normal, conduisant finalement :
 - à des produits protéiques tronqués et donc non fonctionnels : *2D6**3 et *4 ou bien encore *2D6**6, *8, *11, *15, *19, *20, *38, *40, *42, *44 (Kagimoto *et al.*, 1990).
 - à des produits protéiques complets mais non fonctionnels : *2D6**7, *12, *14, *18 (Evert *et al.*, 1997).
- des grandes délétions chromosomiques entraînant la suppression de la totalité du gène *CYP2D6* : *2D6**5 (Gaedigk *et al.*, 1991 ; Daly *et al.*, 1996b).

Chez les Caucasiens, l'allèle nul le plus fréquent (20 à 25%) est le *2D6**4. En revanche, sa fréquence ne dépasse pas les 1% dans les populations orientales et elle est d'environ 6 à 7%

chez les Africains et Afro-Américains (Johansson *et al.*, 1994 ; Dahl *et al.*, 1995 ; Leathart *et al.*, 1998 ; Griese *et al.*, 1999).

L'allèle *2D6*5*, associé à une délétion totale du gène *CYP2D6*, semble être présent à des fréquences de 1 à 10% en fonction de l'origine ethnique.

3.2.5. Gènes hybrides

Il a été observé que le *CYP2D6* pouvait également subir des conversions et des événements de recombinaison impliquant le pseudogène *CYP2D7P* et des séquences environnantes, pour former des gènes hybrides *2D6/2D7P* (Zanger *et al.*, 2004 ; Gaedigk *et al.*, 2007 ; Kramer *et al.*, 2009). Plusieurs allèles composés de gènes hybrides ont été mis en évidence (*2D6*13* et **16*). Les différents arrangements géniques possibles sont présentés en Figure 32. Le caractère fonctionnel ou non fonctionnel de ces allèles, porteurs de gènes hybrides, reste cependant encore indéterminé.

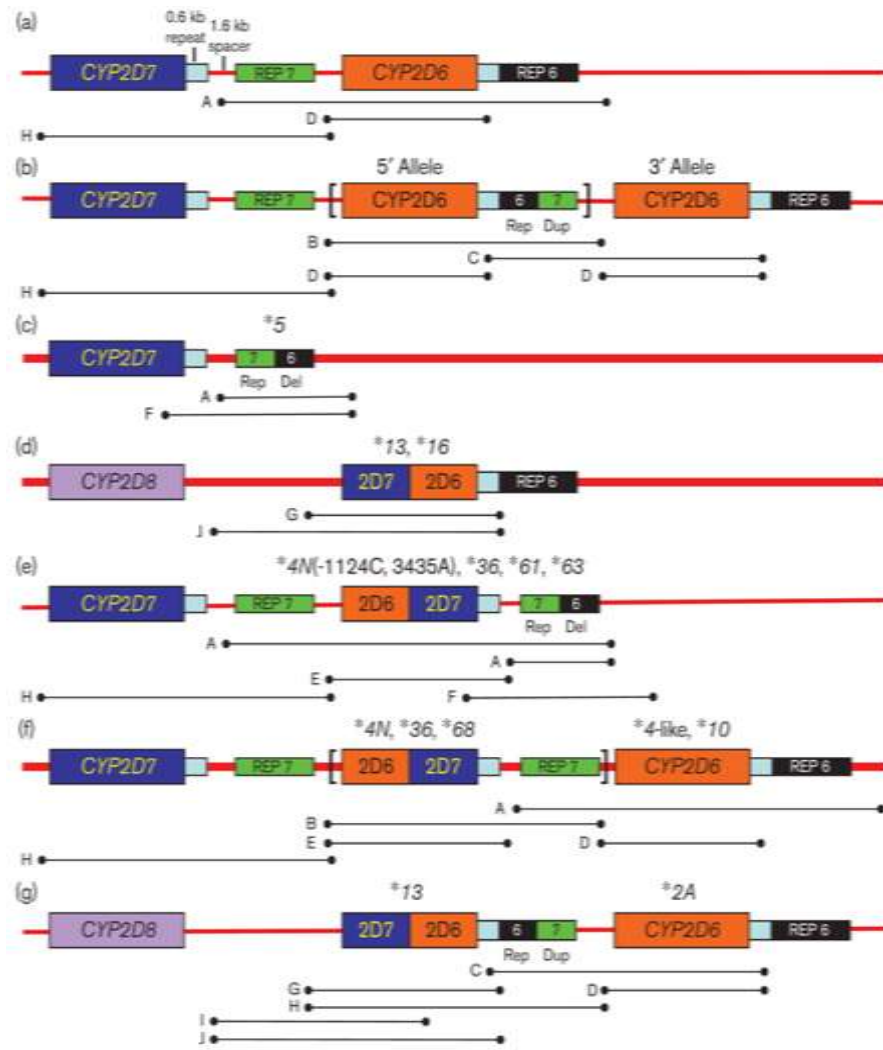


Figure 32 : Arrangements géniques du *CYP2D6*, *CYP2D7P* et *CYP2D8P* (d'après Kramer *et al.*, 2009). Les lignes avec des lettres sous les allèles indiquent les fragments obtenus par PCR. Le *CYP2D8P* est présent dans tous les allèles mais n'est représenté que dans le (d) et le (g). (a) : gène *CYP2D6* normal précédé de *CYP2D7P*, (b) : duplication du gène *CYP2D6*, rep dup est un hybride contenant une séquence en 5' de rep 6 et une séquence en 3' de rep7, (c) : délétion du gène *CYP2D6*. Rep del est un hybride contenant un 5' rep7 et un 3' rep6, (d) : hybride *CYP2D7P/2D6*, avec perte de *CYP2D7P* et de rep7. (e) : hybride *CYP2D6/2D7P* avec une séquence rep del à la suite, (f) : gène hybride *CYP2D6/D7P* avec un réarrangement chevauchant suivi de rep7 avant l'extrémité 3' de *CYP2D6*. Des multiplications (non détectées dans cette étude) de la séquence présentée entre crochets sont possibles, (g) : duplication partielle avec un gène hybride *CYP2D7P/CYP2D6* suivie par rep dup avant le 3' du gène *CYP2D6*.

3.2.6. Gradient Nord/Sud dans l'expression du *CYP2D6*

La fréquence des allèles est connue pour varier entre les différents groupes ethniques (Bradford, 2002).

Pour les Caucasiens, les allèles fonctionnels sont prédominants, avec une fréquence d'environ 70%. Les allèles non fonctionnels représentent, quant à eux, 25% de la variabilité, principalement avec l'allèle *CYP2D6*4* (Figure 33).

Chez les Asiatiques, les allèles fonctionnels sont un peu moins représentés avec environ 50%. Il en est de même pour les Africains et les Afro-Américains.

En revanche, les populations où la proportion d'allèles non fonctionnels est la plus faible, sont les asiatiques et les africains (6%) par rapport aux afro-américains (14,5%) et aux caucasiens (25%).

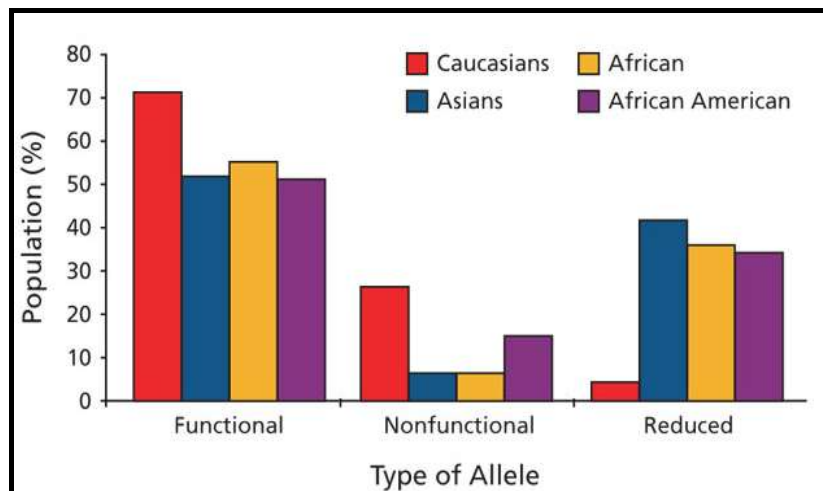


Figure 33 : Fréquence des allèles fonctionnels, non fonctionnels chez les populations caucasiennes (européennes), africaines, afro-méricaines et asiatiques (d'après Bradford, 2002).

La présence d'un gradient Nord/Sud est rapidement apparu, lors des déterminations de phénotypes et de génotypes, compatible avec une origine africaine de l'humanité et montrant une adaptation du génome au type d'alimentation (Ingelman-Sundberg, 1999 ; 2005).

Le pourcentage de porteurs de multiples copies du gène *CYP2D6*, est plus important dans les pays d'Afrique du Nord-Est (>20%) par rapport au pays d'Europe, et notamment en Europe du Nord (1-2%) (Dahl *et al.*, 1995 ; Bathum *et al.*, 1998 ; Sachse *et al.*, 1997). Une fréquence intermédiaire a été trouvée dans la population espagnole, avec 7-10% d'allèles portant plusieurs copies du gène *CYP2D6*, un phénomène pouvant s'expliquer par la migration musulmane en Espagne et dans les autres pays méditerranéens (Agúndez *et al.*, 1995).

Les données ont également montré une fréquence relativement faible de duplications et de multiduplications dans les pays d'Orient et en Afrique australe (Figure 34).

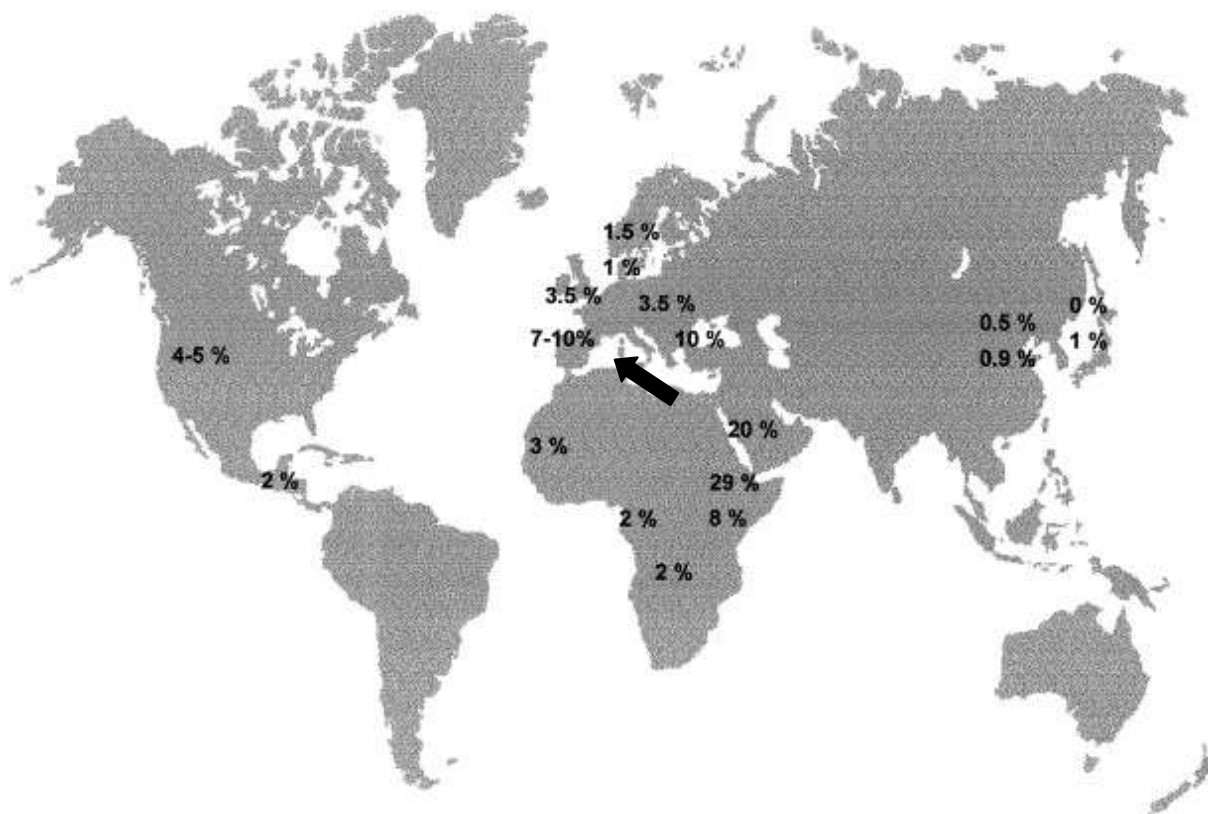


Figure 34 : Distribution mondiale (en %) des allèles portant des duplications ou multiduplications du gène *CYP2D6* (d'après Ingelman-Sundberg, 1998). La flèche représente les migrations de populations musulmanes, qui peuvent expliquer la plus forte prévalence de duplications en Espagne.

Le CYP2D6 est connu pour avoir une très forte affinité pour les toxines végétales comme les alcaloïdes. La base de cette sélection serait due à la capacité du CYP2D6 de détoxification des alcaloïdes, ce qui augmente la disponibilité de la nourriture potentielle pour les porteurs de multiples copies du gène *CYP2D6* et serait donc bénéfique pour la survie dans des périodes de famine (Ingelman-Sundberg, 2001).

Le métabolisme de la débrisoquine a été comparé chez des Ethiopiens vivant en Ethiopie par rapport à des Ethiopiens vivant en Suède et à des Suédois vivant en Suède et a révélé que les Ethiopiens natifs avaient métabolisme le plus faible, suivie par les Ethiopiens en Suède et par les Suédois natifs. L'hypothèse, selon laquelle la nourriture consommée par les Ethiopiens, contenant probablement une grande quantité d'alcaloïdes, inhiberait l'activité du CYP2D6, semble évidente. Cet élément pourrait en effet être un évènement déclencheur pour la sélection génétique, avec l'apparition de duplications et de multiduplications. La population éthiopienne aurait donc développé ces mécanisme de protection il y a des dizaines de milliers d'années, de sorte que la nourriture ne présente plus une toxicité importante. Une pression de sélection a eu lieu favorisant la survie des sujets pouvant détoxifier les toxines végétales à une

plus large mesure. Ces mécanismes ont eu pour conséquences de créer des sous-populations portant plusieurs copies du gène *CYP2D6* actif et d'autres, portant des allèles sans gènes *CYP2D6* inactifs (Figure 35).

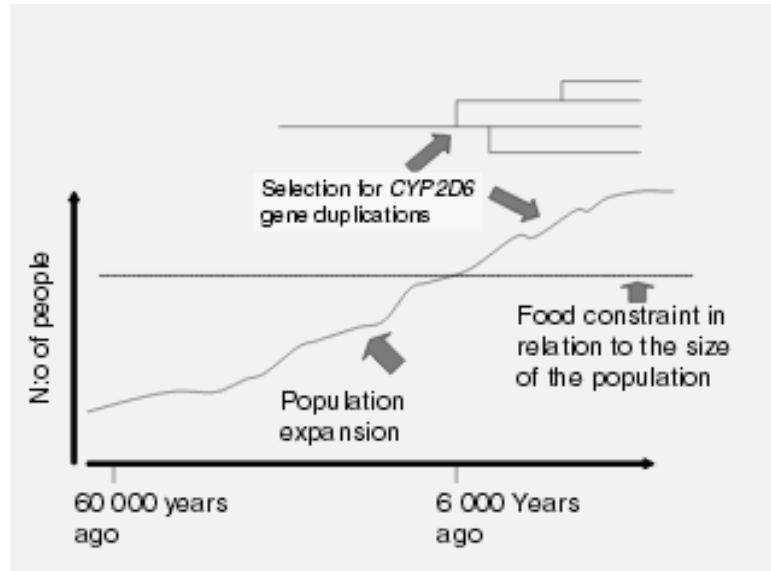


Figure 35 : Mécanisme proposé d'une sélection des allèles portant de multiples copies du gène *CYP2D6* actif en rapport avec le régime alimentaire chez des populations du Nord-Est de l'Afrique (d'après Ingelman-Sundberg, 2005). Ce phénomène se serait produit il y a 5000 à 10 000 ans.

3.3. Conséquences de la relation génotype/phénotype en clinique

Les relations génotype-phénotype du *CYP2D6* et leurs conséquences pharmacocinétiques et cliniques sont schématiquement présentées dans la Figure 36 (Zanger *et al.*, 2004). Un métabolisme lent (PM) a pour conséquence clinique une accumulation du médicament dans l'organisme, avec un risque accru d'effets indésirables. A l'inverse, un métabolisme ultra-rapide (UM) entraîne une inefficacité clinique du médicament, qui est trop rapidement métabolisé et éliminé. Le phénotype intermédiaire (IM) provoque, quant à lui, une réponse exagérée et un risque d'effets indésirables un peu plus important, par rapport au phénotype normal (EM).

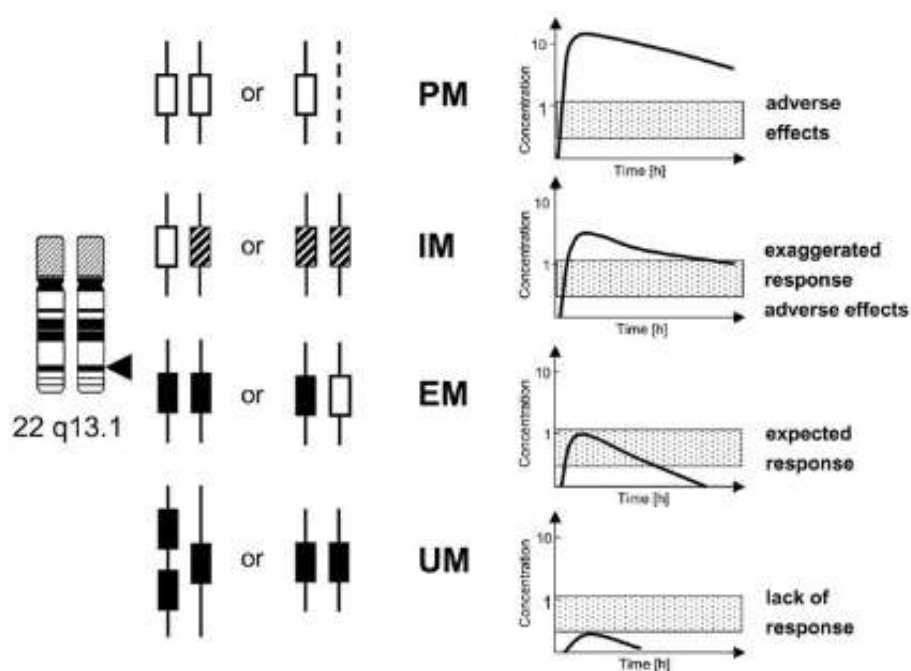


Figure 36 : Relations génotype-phénotype du CYP2D6 et conséquences sur la pharmacocinétique et la clinique (d'après Zanger *et al.*, 2004)

En principe, le phénotypage et le génotypage sont utilisés pour prédire la capacité de métabolisation d'un médicament par le système enzymatique d'un individu. Cependant, les corrélations génotype-phénotype sont parfois difficiles à établir.

OBJECTIFS

Ma thèse fait partie d'une étude ancillaire du projet de recherche clinique OPAL (« Opiates and PhArmacoLogY »), étudiant le développement de co-addictions chez des patients sous TSO. Cette étude est effectuée uniquement chez les patients recevant de la méthadone et vise à déterminer si une faible concentration plasmatique de méthadone, d'une part, et un profil génétique de métaboliseurs ultra-rapides, d'autre part, pourraient être liés au développement de co-addictions (alcool, jeux, sexe...). Une faible concentration plasmatique du TSO, peut être expliquée par une posologie mal adaptée, des interactions pharmacocinétiques, une mauvaise observance, ou bien encore par un métabolisme ultra-rapide.

Selon les données de la littérature, un métabolisme ultra-rapide de la méthadone peut être expliqué par la présence de duplications du gène *CYP2D6* ou d'un SNP spécifique de l'allèle *CYP2D6*35* (c.31G>A). Parmi les différentes techniques de biologie moléculaire actuellement utilisées, nous avons choisi d'utiliser la *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) pour détecter les duplications et la *High Resolution Melting* (HRM), associée au séquençage, pour mettre en évidence dans l'exon 1 du *CYP2D6* le SNP spécifique de l'allèle *CYP2D6*35*.

Différents patients de la population générale, d'origine caucasienne, ont été utilisés pour mettre au point ces deux techniques.

MATERIELS ET METHODES

1. Choix des échantillons à tester

Au total, 116 ADN de patients anonymisés ont été testés, que l'on peut diviser en deux groupes :

- 3 ADN contrôles positifs, provenant du laboratoire de Pharmacologie du CHU Bicêtre à Paris : 2 contrôles positifs de duplication totale du *CYP2D6* et 1 contrôle de délétion totale du *CYP2D6*. A noter que les duplications et les délétions totales ne concernent qu'un seul des deux allèles.
- 113 ADN de patients provenant de la banque d'ADN du laboratoire de Génétique du CHU de Nantes.

2. Description des méthodes utilisées pour la détection des polymorphismes génétiques

Nous avons utilisé deux techniques de biologie moléculaire différentes, la MLPA et la HRM, afin de mettre en évidence les polymorphismes génétiques du *CYP2D6*, et notamment les duplications et le SNP spécifique de l'allèle *35, déjà décrits dans la littérature.

2.1. Régions testées

La MLPA nous a permis de rechercher les réarrangements sur la totalité du gène *CYP2D6*, par l'intermédiaire du kit MLPA (MRC Holland P128-B2), de l'exon 1 jusqu'à la région située en aval de l'exon 9, appelée « downstream » (ds) (Cf. Annexe 1). Ce kit contient les amorces et les sondes spécifiques des exons 1, 4, 5, 6 et 9ds. L'absence d'amplification des exons 2, 3, 7 et 8 est justifiée par l'absence de délétions ou de duplications isolées décrites pour ces exons. Ce kit MLPA n'est pas spécifique du *CYP2D6* et permet de tester une large gamme d'enzymes de métabolisation, notamment d'autres cytochromes P450.

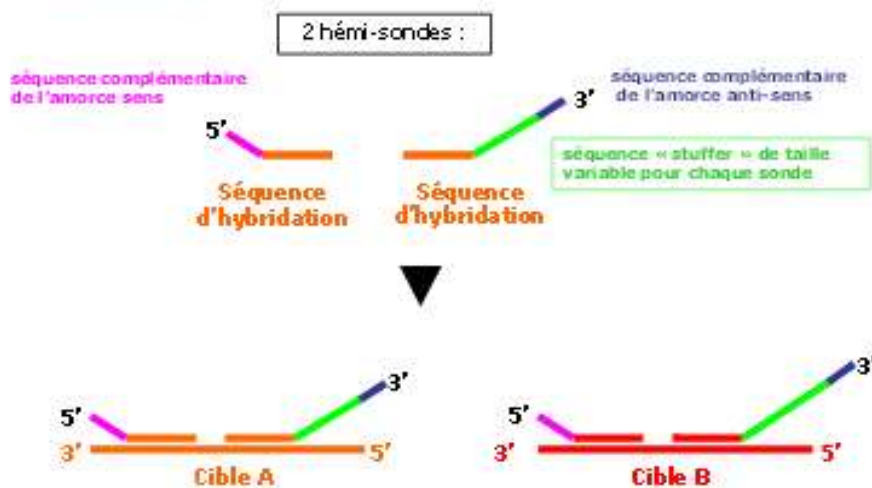
2.2. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Le principe de la MLPA repose sur l'amplification simultanée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de différentes sondes hybridées aux séquences nucléiques d'intérêt, grâce à une

seule paire d'amorces oligonucléotidiques, dont l'une est fluorescente. Le nombre de cycle de PCR est limité pour rester quantitatif et pour que l'intensité de fluorescence d'un produit de PCR reflète le nombre de copies de séquence présentes initialement.

Comme le montre la Figure 37, la MLPA peut être divisée en plusieurs étapes (Cf. protocole en annexe 2). Au cours de la première étape, l'ADN double brin est dénaturé et incubé une nuit avec un mélange de sondes. Ces sondes se composent de deux oligonucléotides distincts, chacun contenant l'une des séquences d'amorces, qui permettra la PCR. Les deux sondes d'oligonucléotides s'hybrident aux séquences cibles immédiatement adjacentes (Figure 37- étape 1). Ce n'est que lorsque les deux sondes sont hybridées à leurs cibles adjacentes qu'elles peuvent être liguées au cours de la réaction de ligation (Figure 37- étape 2). Les sondes liguées sont ensuite amplifiées de façon exponentielle au cours de la réaction de PCR (Figure 37 - étape 3). Les sondes qui ne se sont pas fixées sur l'ADN, ne pourront pas être amplifiées et ne généreront pas de signal. L'élimination des sondes non liées est donc une étape inutile, ce qui rend la méthode MLPA facile à réaliser. Les produits d'amplification sont ensuite séparés les uns des autres par électrophorèse capillaire selon leur taille et détectés par mesure de la fluorescence (Figure 37- étape 4).

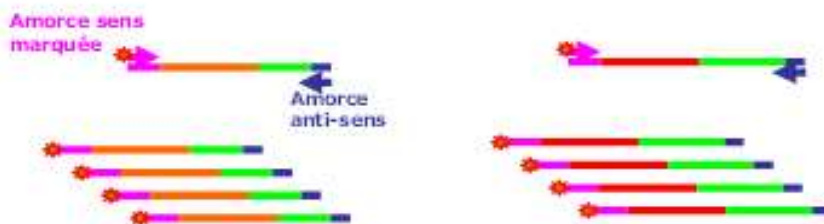
1. Hybridation des sondes



2. Ligation des sondes hybridées par la Ligase 65



3. Amplification des sondes liées par PCR avec un couple unique d'amorces



4. Séparation par électrophorèse à capillaires



Figure 37 : Description des différentes étapes d'une MLPA (d'après <http://theses.clermont-universite.fr/diff/2009CLF1MM19.pdf>).

L'analyse des données est réalisée par des logiciels informatiques spécifiques (GeneMapper™, ABI), à partir des résultats de l'électrophorèse. L'interprétation de ces données n'est possible qu'après une étape de normalisation des intensités de fluorescence, permettant une quantification relative de chaque sonde par rapport aux sondes contrôles et par rapport à un témoin négatif. Il est alors possible d'apprécier le nombre de copies de la région

cible, exprimé chez le patient. Cette analyse nécessite obligatoirement l'utilisation d'une série d'ADN afin de pouvoir comparer les profils.

Les électrophorégrammes sont obtenus à l'aide du logiciel informatique GeneMapper® (ABI). Ce logiciel permet de visualiser séparément ou de façon superposée les électrophorégrammes des différents patients. Chaque pic obtenu après séparation électrophorétique correspond à l'intensité de fluorescence pour un produit de PCR donné et reflète la quantité initiale de la séquence génomique cible.

Le logiciel assigne les tailles en nucléotides pour chaque pic et calcule l'aire sous la courbe ainsi que la hauteur de chacun des pics de chaque individu. C'est par l'analyse visuelle et à l'aide de ces données qu'est estimé le nombre de copies du gène d'intérêt. Comme le montre la Figure 38, les électrophorégrammes sont visualisés de façon superposée, avec notamment au moins un témoin, ce qui facilite la comparaison et la distinction de différences dans le génotype.

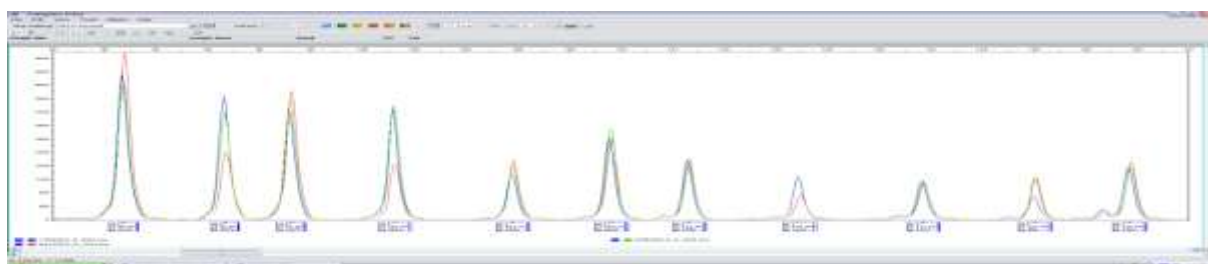


Figure 38 : Electrophorégrammes tirés du logiciel GeneMapper® (ABI), comparant par superposition les pics de trois individus pour différentes sondes.

2.3. HRM (*High Resolution Melting*)

La technique HRM repose sur l'utilisation d'une PCR *touchdown* puis sur l'analyse des courbes de fusion.

La PCR *touchdown* diffère d'une PCR classique par les variations de température au cours des cycles (Figure 39, Cf. protocole en annexe 3). Dans une PCR classique, les variations de température sont les mêmes à chaque cycle d'amplification : dénaturation de l'ADN double brin à 95°C, hybridation des sondes entre 56 et 64°C, élongation à 72°C. En revanche, dans une PCR *touchdown*, la température d'hybridation est plus élevée lors des premiers cycles d'amplification (meilleure spécificité) et sera diminuée de façon progressive à chaque cycle jusqu'à une température plus faible (meilleur rendement).

L'analyse des courbes de fusion, ou analyse HRM, repose sur l'intégration, à de l'ADN amplifié par PCR, d'un intercalant fluorescent saturant (Resolight™). L'agent fluorescent va s'intercaler dans l'ADN double-brins et va ainsi générer une fluorescence. A chaque cycle, la fluorescence mesurée reflète donc la quantité de produit PCR générée.

Par rapport à une PCR classique, une étape de fusion est ajoutée à la fin des cycles d'amplification de manière à visualiser la cinétique de dissociation des produits amplifiés. Cette extension de l'analyse classique des T_m des amplicons, appelée courbe de fusion, est normalement utilisée pour vérifier la spécificité de l'amplification. Les produits de PCR sont généralement caractérisés suivant leurs profils de dissociation (T_m), qui dépendent de la longueur des amplicons et de leurs richesses en GC.

Pendant l'étape de fusion, la température des échantillons est lentement augmentée, de façon linéaire, et la fluorescence de chaque échantillon est détectée en temps réel.

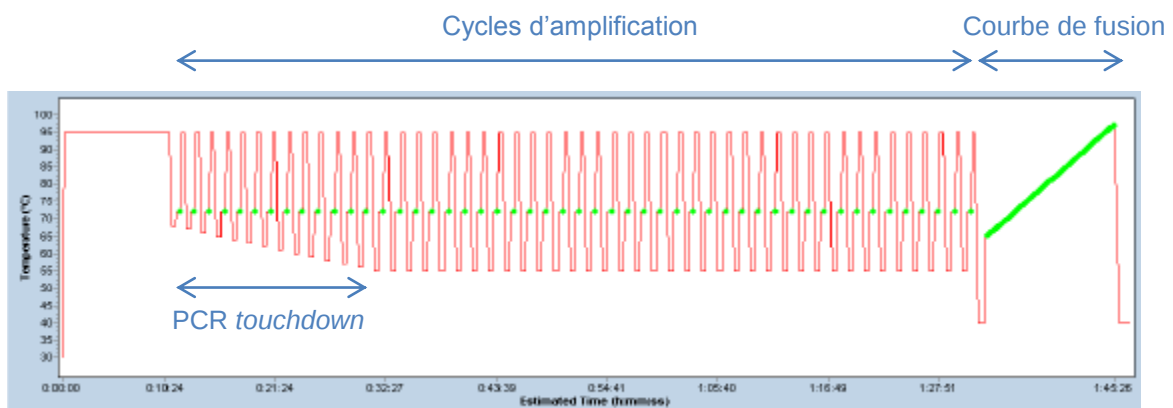


Figure 39 : Principe de la PCR *touchdown* et de l'analyse HRM

L'augmentation de température programmée et progressive entraîne une dénaturation des produits de PCR. Cette dénaturation provoque la libération de l'intercalant fluorescent et induit donc une baisse de fluorescence, puis son extinction totale lorsque la dénaturation est complète.

A un produit de PCR donné correspond donc, pour une montée en température standard, un profil spécifique représenté par une courbe de fusion. Si la séquence d'ADN analysée comporte des variants, des mutations, des délétions, à l'état hétérozygote, il y a présence d'hétéroduplexes (association entre un brin normal lourd et un brin léger, Figure 40) qui se dénaturent plus rapidement. Le profil sera différent révélant ainsi l'existence d'une anomalie identifiée ou non. Dans certains cas, il est également possible de faire la différence entre deux types d'homoduplexes (homozygotes sauvages ou homozygotes variants). Il ne sera pas possible d'identifier précisément la variation, qui nécessitera le séquençage du produit de

PCR. Par cette technique, des variations d'une seule paire de base entre des séquences pourront alors être détectées (Figure 41).

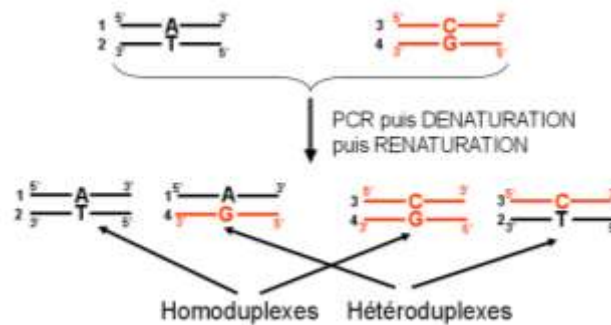


Figure 40 : Principe des homo- et des hétéroduplexes, décrits dans la méthode HRM

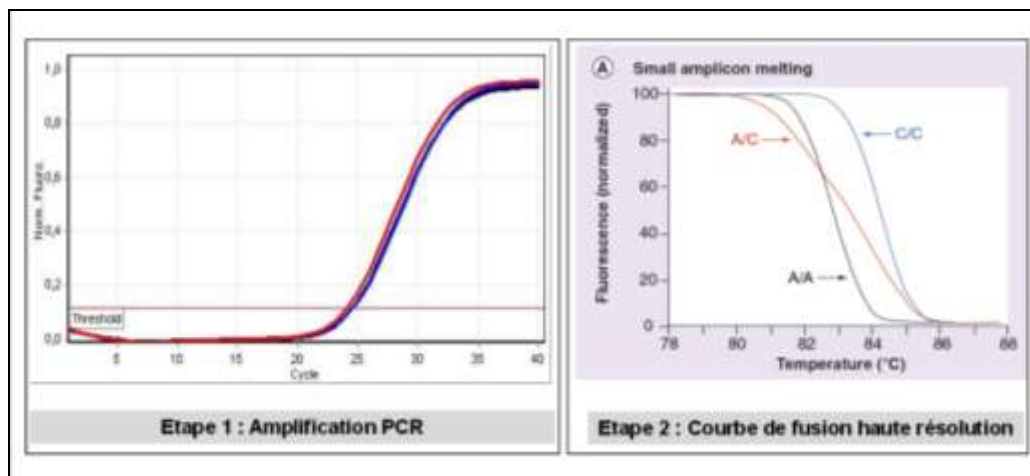


Figure 41 : Analyse HRM de la courbe de fusion après amplification par PCR et détection des homo- et des hétéroduplexes

2.4. Design des oligonucléotides pour l'amplification de l'exon 1

L'allèle *CYP2D6**35 fait l'objet de discussions sur le phénotype qu'il entraîne. Certains semblent penser qu'il serait à l'origine d'un métabolisme ultra-rapide. La mise en évidence de cet allèle est possible par la caractérisation d'un variant, le c.31G>A, situé dans l'exon 1 et qui lui est spécifique. Le choix des oligonucléotides pour amplifier l'exon 1 a tenu compte du degré d'identité de séquence entre le *CYP2D6* et ses pseudogènes, le *CYP2D7P* et le *CYP2D8P*. En effet, pour être certain d'amplifier spécifiquement l'exon 1 du *CYP2D6*, il a fallu trouver en amont et en aval de l'exon 1, des différences de séquence nucléotidique, par rapport aux pseudogènes. Comme le montre la Figure 42, au niveau de l'exon 1, peu de différences existent entre le *CYP2D6*, le *CYP2D7P* et le *CYP2D8P*. Les oligonucléotides ne peuvent se placer qu'au niveau des différences de bases, pour être certain qu'ils soient

spécifiques du *CYP2D6* et qu'ils ne se fixent pas sur les pseudogènes. Le choix du design de ces oligonucléotides s'est donc avéré restreint. L'oligonucléotide 1-F se trouve juste avant le début de l'exon 1, dans la séquence promotrice, alors que l'oligonucléotide 1-R se trouve dans le début de l'intron 1.

CYP2D6	CCCATTTGGTAGTGTAGGCAGGTATGGGCTAGAAGCACTGGTGCCCTGGCCGTGATAGT
CYP2D7P	CCCAGTTGGTAGTGTAGGCAGCCATGGGGCTAGAAGCACTGGTGCCCTGGCCATGATAGT
CYP2D8P	CCCAATGGGCAGTGTAGGCAGCCATGGGGCTGGATGCACTGGTGCCCTGGCAGTGACAGT
	: *g**g**6*****g**g*****87***g***
CYP2D6	GGCCATCTTCCTGCTCCTGGTGGACCTGATGCACCGGCGCAACGCTGGGCTGCACGCTA
CYP2D7P	GGCCATCTTCCTGCTCCTGGTGGACCTGATGCACCGGCAACGCTGGGCTGCACGCTA
CYP2D8P	GGCCATCTTCCTGCTCCTGGTGGACCTGATGCACGAGCACCACGCTGGACTGCACGCTA
	*****g**g*****g*****
CYP2D6	CCCACAGGCCCTGCTCCACTGCCCCGGCTGGGCAACCT-GCTGCATGTGGACTTCCAGA
CYP2D7P	CCCAGCCAGGTCCCTGCTCCACTGCCCCGGCTGGGCAACCTGCTGCATGTGGACTTCCAGA
CYP2D8P	CCCAGCCAGGCCCTGCTCCACTGCCCCGGCTGGGCAACTT-GCTGCATGTGGACTTCCAGA
	6***7*****g*****
CYP2D6	ACACACCATACTGCTTCGACCTGAGGGAGGAGGTCTGGAGGGCGGCAGAGGTCTG
CYP2D7P	ACACACCATACTGCTTCGACAGGTGAGGGAGGAGGTCTGGAGGGCGGCAGAGGTCTG
CYP2D8P	ACAT---ATACACCTTCAACAGGTGAGGGAGGAGGTCTG-----
	g ***gg*g*****
CYP2D6	AGGATGCCCCACCACCAGCAACATGGGTGGTGGGTGAAACACAGGCTGGACCAGAAGC
CYP2D7P	AGGATGCCCCACCACCAGCAACATGGGTGGTGGGTGAAACACAGGCTGGATCAGAAGC
CYP2D8P	AGGATGCCCCACCACCAGCAACATGGGTGGTGGGTGGAGCCACAGTCTGGACAAGAGC
	*****g*****7g**g*****8*****7g*****

Figure 42 : Séquences de l'exon 1 du *CYP2D6*, *CYP2D7P* et *CYP2D8P*. Les étoiles (*) représentent une identité entre les trois séquences. Les chiffres 6 indiquent une différence entre le *CYP2D6* et les deux autres gènes. De même pour les chiffres 7 et 8 qui indiquent une différence par rapport aux deux autres gènes respectivement. Les deux points (:) indiquent une base différente pour les trois gènes. Le codon ATG surligné en verre est le codon initiateur marquant le début de l'exon 1 et le CAG surligné en rouge correspond aux trois derniers nucléotides, signant la fin de l'exon. Les séquences soulignées en noir correspondent aux deux oligonucléotides (*CYP2D6-1F* : CATTTGGTAGTGTAGGCAGGT *CYP2D6-1R* : GAAACCACAGGCTGGACCA).

3. Séquençage

Le séquençage a été utilisé pour compléter la HRM. En effet, le séquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN et dans notre cas, pour l'exon 1 du *CYP2D6*. Les réactions de séquence que l'on utilise au laboratoire repose sur la méthode de SANGER, adaptée à la fluorescence (Cf. protocole en annexe 4). Le séquençage est réalisé à partir des produits de PCR obtenus en HRM. Les amorces utilisées pour le séquençage correspondent à celles utilisées pour l'amplification par PCR de l'exon 1.

RESULTATS ET INTERPRETATION

PARTIE I : VALIDATION DES EXPERIENCES

Les deux techniques de biologie moléculaire ont été effectuées selon des protocoles validés au sein du laboratoire (Cf. Annexe 2, 3 et 4) et faisant l'objet de révisions régulières. L'utilisation d'un blanc réactif, entraînant une absence d'amplification, est nécessaire pour s'assurer de l'absence de contamination. De plus, le recours à des témoins positifs de duplications et de délétions permet de valider l'amplification et de faciliter l'analyse des résultats, par comparaison.

PARTIE II : RESULTATS BRUTS

1. MLPA

Seuls 23 ADN de patients sur les 116 ont été testés en MLPA. Ce nombre est justifié par le fait qu'il s'agissait juste de la validation de la technique MLPA. Les 3 ADN contrôles nécessaires pour la validation ont été testés de façon anonyme comme les autres ADN.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 12. Les ADN contrôles seront représentés par la lettre T et les ADN des patients du laboratoire de Génétique par la lettre P.

Patients	CYP2D6					Génotype du CYP2D6**
	Exon 1	Exon 4	Exon 5*	Exon 6	Exon 9ds	
T1	3	3	3	3	3	Duplication totale
T2	3	3	3	3	3	Duplication totale
T3	1	1	1	1	1	Délétion totale
P1	3	3	3	3	3	Duplication totale
P2	3	2	3	2	2	Duplication partielle
P3	3	2	3	2	2	Duplication partielle

P4	1	1	1	1	1	Délétion totale
P5	2	2	2	2	2	Normal
P6	2	2	2	2	2	Normal
P7	2	2	2	2	2	Normal
P8	2	2	2	2	2	Normal
P9	2	2	2	2	2	Normal
P10	2	2	2	2	2	Normal
P11	2	2	2	2	2	Normal
P12	2	2	2	2	2	Normal
P13	3	3	3	3	3	Duplication totale
P14	3	3	3	3	3	Duplication totale
P15	3	2	3	2	2	Duplication partielle
P16	1	1	1	1	1	Délétion totale
P17	2	2	2	2	2	Normal
P18	2	2	2	2	2	Normal
P19	2	2	2	2	2	Normal
P20	2	2	2	2	2	Normal

Tableau 12 : Nombre de copies des exons 1, 4, 5, 6 et 9ds déterminé par MLPA et interprétation du génotype. * : la sonde n'est pas spécifique du *CYP2D6* et amplifie aussi l'exon 5 du *CYP2D7P*. Pour simplifier l'interprétation des résultats, le pseudogène *CYP2D7P* ne sera pas pris en compte dans le nombre de copies. ** : les duplications et les délétions totales, et les duplications partielles ne concernent qu'un seul des deux allèles.

2. HRM

La totalité des ADN (116) a été testée en HRM. Les données obtenues ont été divisées en trois groupes (a), (b) et (c) et sont présentées dans la Figure 43 :

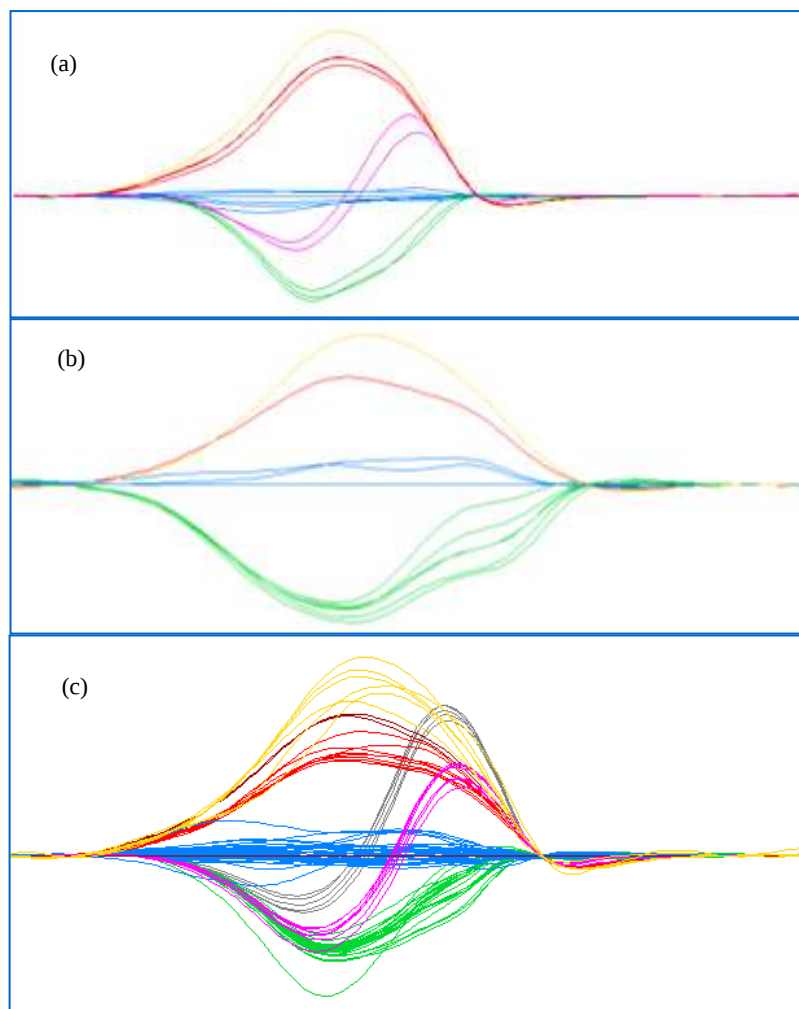


Figure 43 : Analyse HRM tirés du LC480. (a) : groupe de 15 ADN contenant les 3 ADN contrôles (T1 à T3). (b) groupe de 12 ADN dont 3 du groupe (a) et utilisés comme témoins (P6, P4 et P3). (c) groupe de 96 ADN dont 3 ADN témoins du groupe (a) (P6, P4 et P3).

Parmi les 116 ADN testés en HRM, 30 ont été séquencés : tous ceux du groupe (a), tous ceux du groupe (b) et 12 du groupe (c). Pour le groupe (c), les ADN à séquencer ont été sélectionnés sur la base de leur profil, soit un de chaque groupe de couleurs (8) et 4 dont les profils semblaient différents de leur groupe d'attribution. Les résultats sont présentés dans le Tableau 13 ci-dessous :

Patients	courbe HRM	SEQUENCAGE		
		c.31G>A	c.100C>T	variants intron 1
T1	bleue	G	C	7
T2	bleue	G	C	7
T3	bleue	G	C	7
P5	bleue	G	C	7
P7	bleue	G	C	7
P8	bleue	G	C	7
P14	bleue	G	C	7
P16	bleue	G	C	7
P20	bleue	-	-	-
P21	bleue	G	C	7
P22	bleue	G	C	7
P23	bleue	G	C	7
P6	jaune	G/A	C	non
P24	jaune	A	C	non
P25	jaune	G/A	C	-
P26	jaune	A	C	non
P27	gris	G	C/T	7
P3	rose	G	C/T	non
P9	rose	G	C/T	non
P28	rose	G	C/T	7
P10	rouge	G	C	non
P11	rouge	G	C	non
P12	rouge	G	C	non
P13	rouge	G	C	non
P19	rouge	G	C	non
P20	rouge	G	C	non
P1	verte	G	T	7
P2	verte	G	T	7
P4	verte	G	T	7
P31	verte	G	T	7
P32	verte	G	T	7
P15	verte	-	-	-
P17	verte	-	-	-
P18	verte	-	-	-
P19	verte	-	-	-

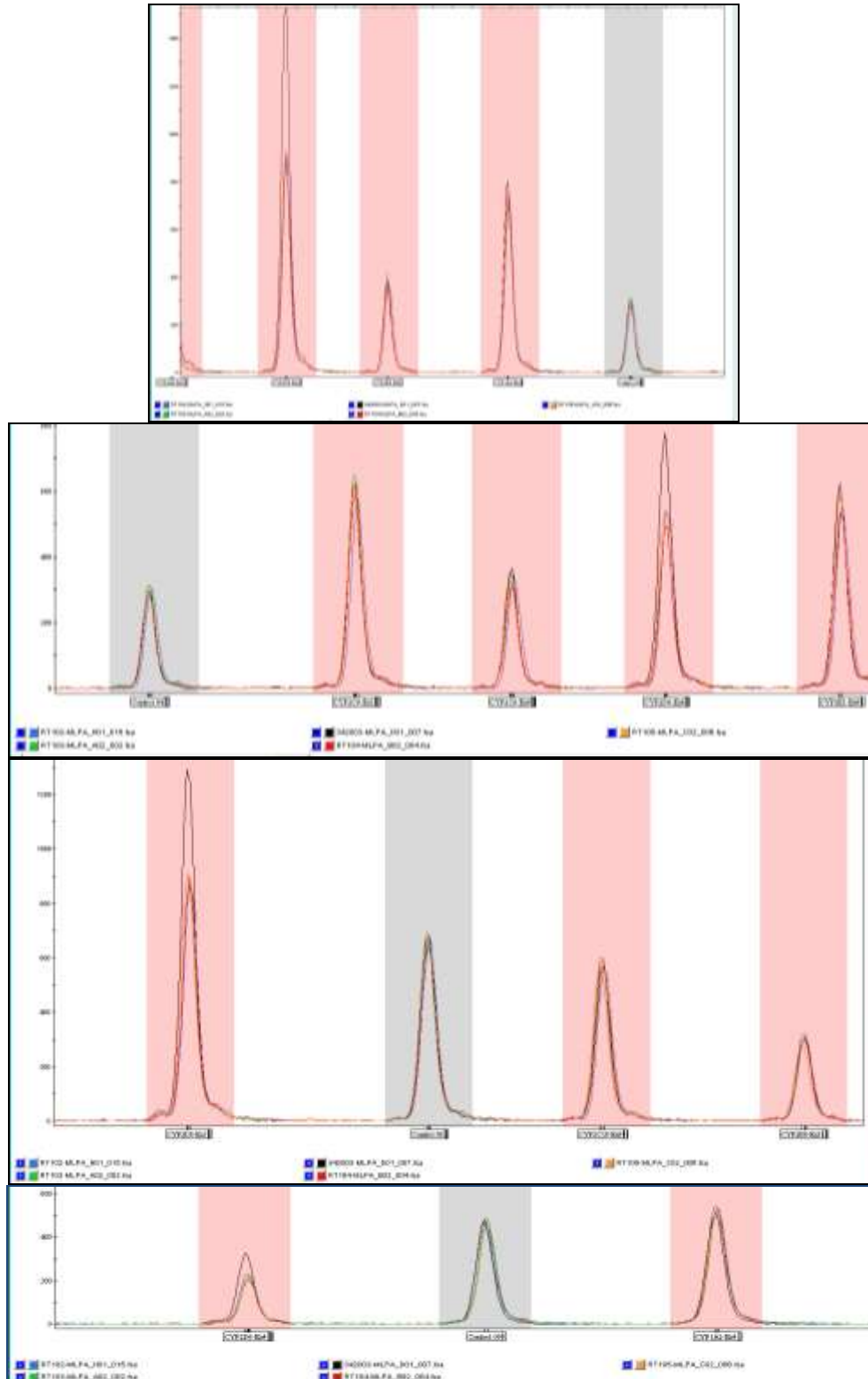
Tableau 13 : Résultats du séquençage de l'exon 1 du CYP2D6 des 3 ADN contrôles et de 32 ADN provenant du laboratoire de Génétique. La colonne « courbe HRM » correspond aux couleurs des profils observés sur les profils de la Figure 43. Les cases indiquent une homozygotie (A, G, C ou T) ou une hétérozygotie (C/T, G/A).

PARTIE III : INTERPRETATION

1. Données de MLPA

Les ADN contrôles (T1 à T3) ont été testés comme tous les autres en aveugle. Pour deux d'entre eux, les résultats montrent 3 copies pour tous les exons du CYP2D6 présents dans le

kit (1, 4, 5, 6 et 9ds, Figure 44). Il s'agit donc bien d'une duplication totale du gène *CYP2D6* sur un des allèles. Pour le troisième échantillon, les exons 1, 4, 5, 6 et 9ds ne présentent qu'une seule copie, témoignant d'une délétion totale du gène *CYP2D6* de l'un des deux allèles (Figure 45).



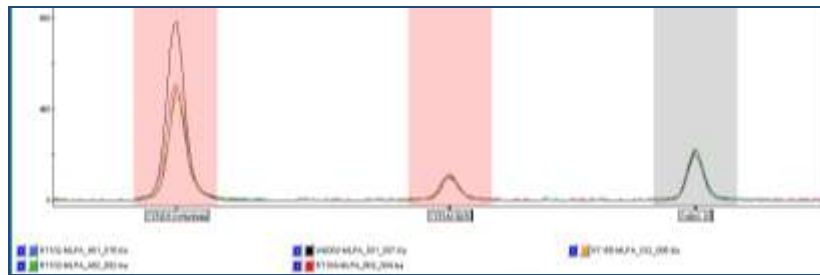


Figure 44 : Electrophorégrammes (P1) tirés du logiciel GeneMapper, duplication totale du gène *CYP2D6*, A. duplication de l'exon 1 (3 copies), B. duplication de l'exon 6 (3 copies), C. duplication de l'exon 5 (5 copies), D. duplication de l'exon 4 (3 copies), E. duplication de l'exon 9 (3 copies).

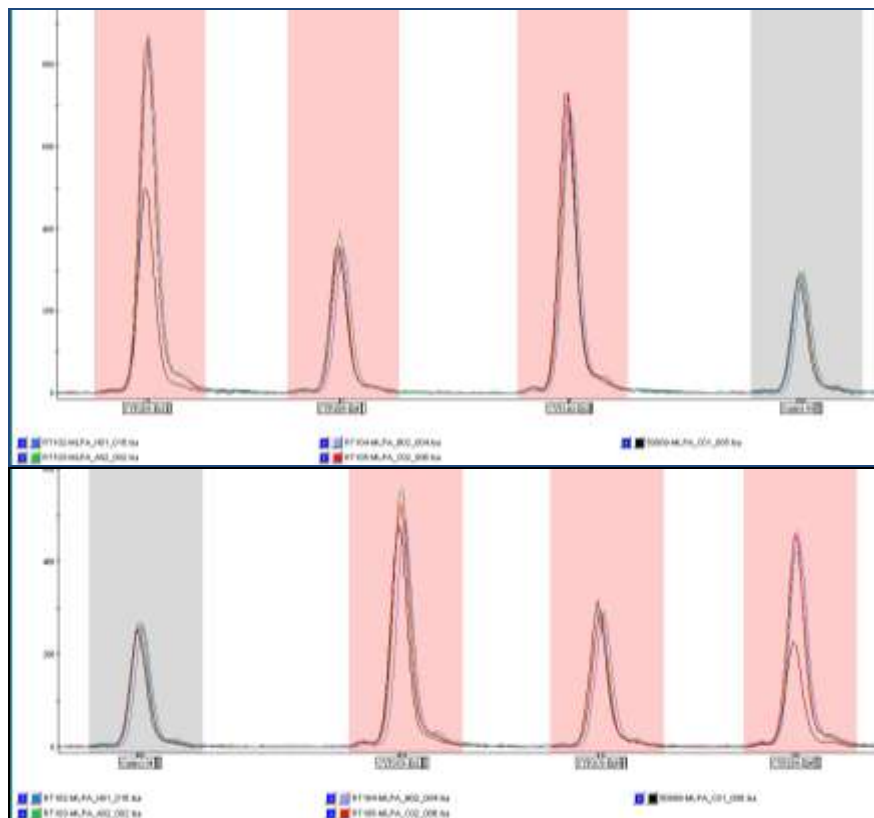
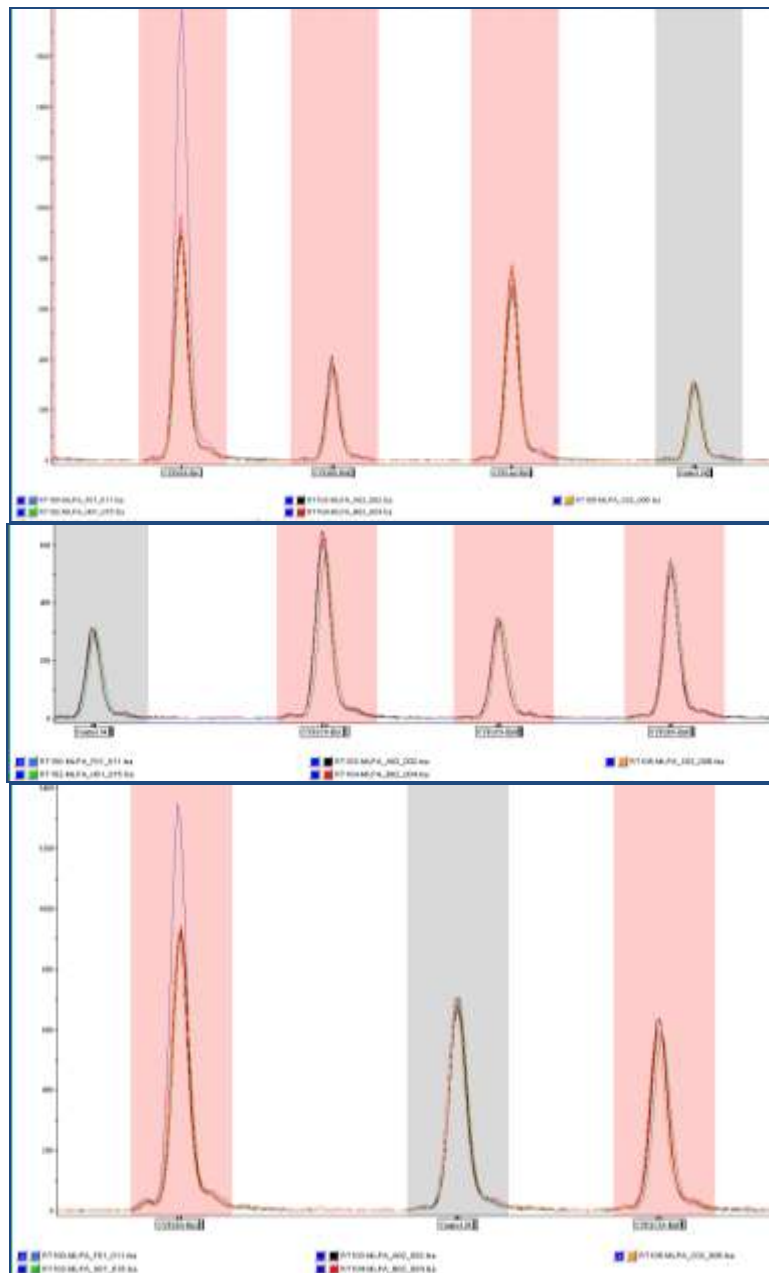
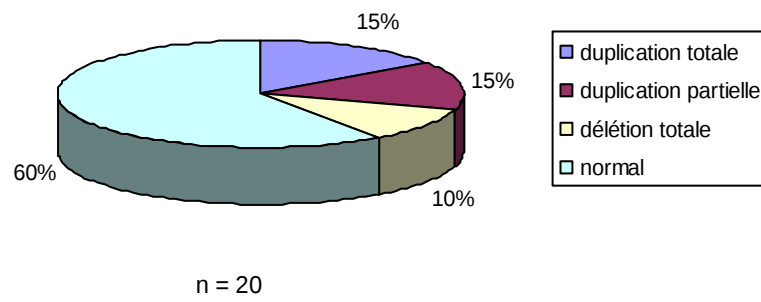


Figure 45 : Electrophorégrammes (T3) tirés du logiciel GeneMapper, délétion totale du gène *CYP2D6*. A. Délétion de l'exon 1 (1 copie), B. Délétion de l'exon 6 (1 copie).

Parmi les 20 ADN de patients testés en MLPA, les résultats, présentés en pourcentage dans la Figure 46, montrent la présence de :

- 3 duplications totales (P1, P13 et P14)
- 3 duplications partielles (P2, P3 et P15 ; Figure 47)
- 2 délétions totales (P4 et P16)
- et 12 ADN normaux



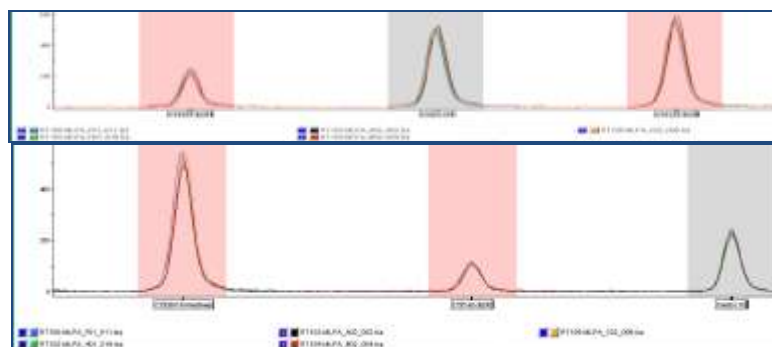


Figure 47 : Electrophorégrammes (P2) tirés de GeneMapper. A. Duplication de l'exon 1 (3 copies). B, D, E. Exons normaux. C. Duplication de l'exon 5 (5 copies).

2. Données de HRM

2.1. Profils des ADN

L'analyse HRM, présentée en Figure 43, sépare en trois groupes les ADN testés : (a), (b), (c). Pour chaque groupe, le logiciel informatique LightCycler480™ rassemble les échantillons présentant le même profil avec une couleur similaire. Il est donc possible de considérer que les échantillons partageant la même couleur et le même profil ont des séquences très similaires voire identiques. Cependant, seul le séquençage peut affirmer ou infirmer cette hypothèse, il est donc systématiquement réalisé pour les groupes d'intérêt.

Pour les trois groupes (a), (b), (c), les courbes bleues, suivant la ligne de base, sont les échantillons servant de référence pour créer les autres groupes.

3. Données de séquençage

Rappelons que le variant c.31G>A n'est retrouvé que dans l'allèle *CYP2D6**35, donc si un patient présente ce variant, il est certain que ce patient possède au moins un allèle *35. Un autre variant, le c100.C>T, est retrouvé dans de nombreux allèles (*CYP2D6**4, *10, *14, *36, *37, *47, *49, *56, *57, *64, *65, *68, *69, *72, *100, *101) mais n'est pas présent sur l'allèle *35 donc ce SNP permet d'exclure la présence d'un allèle *35.

Sur les 30 patients séquencés (Tableau 13), trois présentent le variant c.31G>A (P6, P16 et P18). Deux d'entre eux se présentent sous forme hétérozygote, confirmant la présence d'un seul allèle *35 tandis que le dernier se présente sous forme homozygote ou hémizyote, révélant respectivement la présence de deux allèles *35 ou d'un seul associé à une délétion.

Parmi les 116 ADN testés en HRM, trois autres ADN présentent le « profil *allèle *35* » (représenté par les courbes jaunes sur la Figure 43). Il est possible de faire l'hypothèse que ces trois ADN présentent également au moins un allèle *35. L'un d'eux a été séquencé (P25), mais il s'avère qu'en raison de difficultés techniques (faible intensité de l'amplification), il n'est pas possible de conclure quant à son génotype. Cet ADN ne sera donc pas pris en compte dans les résultats. Pour les deux autres ADN présentant ce profil, seul le séquençage permettra de déterminer avec certitude s'ils présentent un, deux ou bien aucun allèle *35. On estime, avec les données disponibles, la présence d'au moins un allèle *35 dans 4,3% des cas (5/115).

Sept variants ont été également observés dans l'intron 1 pour certains ADN séquencés (Tableau 14). Ces variants, décrits dans les bases de données de SNPs (DbSNP, Database of SNP), ont une fréquence encore inconnue. L'exon 1 se termine en terme de bases en 180. Les positions des SNPs dans l'intron seront donc numérotées, selon une nomenclature spécifique (*Nomenclature for the description of sequence variants, Human Genome Variation Society*), à partir de la fin de l'exon 1.

Patients	Variants de l'intron 1						
	c.180+34	c.180+41	c.180+43	c.180+47	c.180+52	c.180+53	c.180+65
	C>G	A>C	G>C	C>T	C>G	C>A	G>A
T1	G	C	C	T	G	A	A
T2	G	C	C	T	G	A	A
T3	G	C	C	T	G	A	A
P5	G	C	C	T	G	A	A
P7	G	C	C	T	G	A	A
P8	G	C	C	T	G	A	A
P21	G	C	C	T	G	A	A
P22	G	C	C	T	G	A	A
P23	G	C	C	T	G	A	A
P14	G	C	C	T	G	A	A
P16	G	C	C	T	G	A	A
P20	-	-	-	-	-	-	-
P6	C	A	G	C	C	C	G
P24	C	A	G	C	C	C	G
P25	-	-	-	-	-	-	-
P26	C	A	G	C	C	C	G
P27	G	C	C	T	G	A	A
P3	C	A	G	C	C	C	G
P9	G	C	C	T	G	A	A
P28	G	C	C	T	G	A	A

P10	G	C	C	T	G	A	A
P11	G	C	C	T	G	A	A
P12	G	C	C	T	G	A	A
P29	C	A	G	C	C	C	G
P30	C	A	G	C	C	C	G
P13	C	A	G	C	C	C	G
P1	G	C	C	T	G	A	A
P2	G	C	C	T	G	A	A
P4	G	C	C	T	G	A	A
P31	G	C	C	T	G	A	A
P32	G	C	C	T	G	A	A
P15	-	-	-	-	-	-	-
P17	-	-	-	-	-	-	-
P18	-	-	-	-	-	-	-
P19	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 14 : Résultats de séquençage pour les sept variants dans l'intron 1. Les cases indiquées en blanc indiquent des homozygotes sauvages et celles indiquées en bleues des hétérozygotes variants.

DISCUSSION

1. Méthodologie utilisée

1.1. Sélection des cibles

Malgré le fait qu'ils ne provenaient pas de patients sous TMM, les ADN testés lors de ce projet ont permis l'évaluation et la validation du Kit MRC-Holland pour la MLPA et la détermination de la fréquence de l'allèle *CYP2D6**35 en HRM/séquençage. Tous les ADN ont été testés de façon anonyme pour ne pas influencer l'interprétation des résultats.

1.2. Mise au point des conditions de MLPA

La méthode MLPA s'est avérée sensible et facile à mettre en œuvre. Cette méthode n'a nécessité aucune mise au point. L'utilisation de contrôles positifs de duplications et de délétions a permis de valider les résultats obtenus.

La MLPA a été récemment décrite dans la littérature comme étant une méthode simple permettant non seulement de mettre en évidence les duplications et les délétions mais également les gènes hybrides (Kim et al., 2012). Les résultats de MLPA concordaient parfaitement avec les résultats observés par *long-range PCR*, ce qui en fait une méthode fiable et applicable en routine.

1.3. Mise au point des conditions de HRM

La mise au point des conditions de HRM a été relativement aisée. L'étape de fusion dans le programme de PCR utilisé s'effectuait de 75 à 92°C. Lors du premier essai de HRM (dont les résultats ne seront pas présentés), nous avons remarqué que la dénaturation n'était pas tout à fait complète à 92°C. Il a donc fallu augmenter la température à 98°C pour être certain de dénaturer la totalité des ADN.

La normalisation a révélé, par la modification du profil de certaines courbes, la présence de dimères d'amorces pour certains ADN. La migration sur gel d'agarose a permis de confirmer la présence de ces dimères d'amorces.

Les dimères d'amorces sont le résultat de la reconnaissance et de l'hybridation de deux amorces entre elles. Afin d'éviter la formation de ces dimères d'amorces, il a fallu diminuer la quantité d'amorces par deux et augmenter la quantité d'ADN.

1.4. Limites

La technique MLPA comporte quelques limites. Cette méthode ne permet de rechercher que des grands réarrangements (duplications et délétions). Comme mentionné plus tôt, les sondes MLPA sont conçues pour être très spécifiques à la séquence cible. La présence éventuelle de SNPs ou de répétitions peut nuire à la bonne hybridation de celles-ci et biaiser les résultats.

La HRM est, quant à elle, une méthode adaptée pour la recherche de SNPs. Le choix des oligonucléotides a été restreint en raison de l'existence de pseudogènes. En effet, l'amplification du début de l'intron 1 a complexifié l'analyse HRM, en agissant comme « parasite ». La séparation des échantillons en groupes de profil (indiqué chacun par une couleur différente) peut être parfois assez délicate. Les profils représentés par les courbes jaunes, marron et rouges sur la Figure 43-(c) sont très proches, il est donc difficile de les discriminer, même si un gradient de courbe semble évident. Pour un grand nombre d'échantillons, cette méthode est totalement adaptée, puisque dans le cas d'une étude de population, elle permet un pré-screening des échantillons. Il ne faudrait donc séquencer que les ADN présentant les profils représentés par les courbes rouges, jaunes et marron pour être certain de n'isoler que ceux portant un allèle *35, le reste des échantillons pouvant être écartés.

D'autres méthodes pour identifier les polymorphismes du *CYP2D6* sont décrites dans la littérature, telles que la *long-range PCR*, la *PCR-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) ou même la PCR temps réel allèle spécifique (AS-PCR). Bien que nécessitant plus de mises au point, certaines de ces techniques de biologie moléculaire ont été comparées entre elles et montrent des résultats similaires à ceux obtenus en MLPA et HRM (Sachse *et al.*, 1997 ; Johansson *et al.*, 1996 ; Müller *et al.*, 2003 ; Chou *et al.*, 2003 ; Gaedigk *et al.*, 2007 ; Gaedigk *et al.*, 2010a).

2. Résultats obtenus

Ma thèse a permis de valider une approche génétique permettant de mettre en évidence les polymorphismes génétiques du *CYP2D6* pouvant expliquer un métabolisme ultra-rapide.

Selon les données de la littérature, un des mécanismes principaux responsables d'un métabolisme ultra-rapide est la duplication, c'est-à-dire la présence de copies supplémentaires

du gène *CYP2D6* sur un même allèle (Bertilsson *et al.*, 1993 ; Johansson *et al.*, 1993 ; Lundqvist *et al.*, 1999).

Nos résultats de MLPA montrent que sur 20 ADN testés provenant de patients de la population générale, trois présentent une duplication totale du *CYP2D6* (15%) et trois présentent des duplications partielles (15%). Si l'on compare ces résultats aux données de la littérature pour la population générale d'origine caucasienne, nos résultats sont légèrement supérieurs. En effet, les pourcentages de duplication généralement observés chez les caucasiens sont de l'ordre de 1 à 4%, excepté pour les pays d'Europe du Sud (Espagne) avec 5 à 10% de duplications (Griese *et al.*, 1998 ; Johansson *et al.*, 1996 ; Sachse *et al.*, 1997 ; Abraham & Adithan, 2001 ; Zanger *et al.*, 2004 ; Ingelman-Sundberg, 2005 ; Gaedigk *et al.*, 2007).

Ces différences peuvent s'expliquer en raison du petit nombre d'ADN testés. Les patients anonymisés du laboratoire sont majoritairement d'origine caucasienne mais il se peut qu'il y ait d'autres ethnies représentées, faisant augmenter le pourcentage de duplications et biaisant les résultats.

Par ailleurs, la duplication n'aboutit pas toujours à une protéine fonctionnelle. Les données de la littérature ont tout d'abord décrit des duplications de l'allèle *CYP2D6**2 mais très rapidement, d'autres allèles, qu'ils soient fonctionnels ou non, se sont révélés duplicables, tels que les allèles *1,*4 ou le *35. Seule la duplication d'un allèle fonctionnel entraîne une augmentation de la fonction enzymatique du *CYP2D6*. Un grand nombre d'allèles dupliqués sont des allèles non fonctionnels, n'expliquant alors pas la survenue d'un phénotype UM (Chida *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2006 ; Gaedigk *et al.*, 2007). La MLPA détecte sensiblement les duplications mais n'est pas capable de déterminer le type d'allèle qui porte la duplication ni si les allèles sont fonctionnels (Kim *et al.*, 2012). Cela signifie que, au total, sur les trois ADN porteurs de duplications totales, il n'est pas possible de déterminer par MLPA combien ont des duplications aboutissant à un métabolisme ultra-rapide. Seule une technique de PCR temps réel allèle spécifique pourrait le déterminer.

D'autre part, la littérature ne précise pas si les duplications partielles sont prises en compte dans la totalité des duplications décrites, notamment certains articles plus anciens, pour lesquels les techniques de biologie moléculaire ne permettaient pas de détecter ces duplications partielles.

Parmi les duplications mises en évidence lors des expériences, trois ADN ont présentés une duplication partielle du gène *CYP2D6*, c'est-à-dire une duplication de 2 exons sur les 5 testés (exon 1 et exon 5).

En 2009, une étude menée par Kramer *et al.* a testé 54 ADN contenant de rares allèles homozygotes, ou ayant fait l'objet de tests avec des résultats ambigus, et d'autres portant deux allèles différents avec des signaux de duplication.

Sur les 54 ADN, 4 présentaient des structures dupliquées partiellement, soit 7,4%. Les duplications partielles du gène *CYP2D6* ont fait l'objet de nombreuses recherches mais leurs conséquences phénotypiques et donc cliniques restent encore assez mal connues. Ces duplications partielles font intervenir le pseudogène *CYP2D7P*, par la formation de gènes hybrides *CYP2D6/2D7* (Zanger *et al.*, 2004 ; Gaedigk *et al.*, 2007 ; Kramer *et al.*, 2009 ; Gaedigk *et al.*, 2010a).

Dans une étude récente, Gaedigk *et al.* (2009) ont mis en évidence des discordances chez un patient génotypé *CYP2D6**4/*4 mais présentant un phénotype incohérent. La découverte des conversions et des recombinaisons entre le *CYP2D6* et le *CYP2D7P*, a permis d'affiner la détermination de son génotype, qui était finalement *4/*35.

Plus récemment, il a été mis en évidence de nouveaux réarrangements géniques. Le caractère fonctionnel ou non fonctionnel des protéines codées par ces gènes hybrides *CYP2D7P/2D6* n'a pas encore été déterminé. En plus des allèles *CYP2D6**13 et *66 déjà connus, trois nouveaux hybrides non fonctionnels (*CYP2D6**67, *79 et *80) ont été découverts (Gaedigk *et al.*, 2009).

Le locus du gène *CYP2D* contient un grand nombre de régions répétées et des gènes hautement homologues qui facilitent les recombinaisons, pouvant conduire à des variants alléliques peu communs. Les gènes hybrides sont des produits de recombinaison qui proviennent de grandes suppressions, ce qui a lié les extrémités respectives des deux gènes ensemble pour former ces hybrides.

Même s'ils ne sont pas complètement caractérisés, Kramer *et al.* (2009) ont également observé des gènes hybrides *CYP2D7/2D6* dans des réarrangements simples et en tandem, fournissant une preuve supplémentaire que ces gènes hybrides peuvent ne pas être aussi rares qu'on le croit généralement.

On estime que ce type de réarrangements géniques représente, pour la population caucasienne, approximativement 0.25% des duplications (Gaedigk *et al.*, 2010b). Néanmoins, même si ces hybrides sont certainement sous-estimés, ils sont rarement à l'origine d'une

protéine fonctionnelle (Black *et al.*, 2012). Ils ne seraient donc pas responsables d'un métabolisme ultra-rapide.

De plus, même si les duplications du gène *CYP2D6* actif prédisent un métabolisme ultra-rapide, l'inverse n'est pas forcément le cas (Bergmann *et al.*, 2001). C'est ce qui explique pourquoi seule une petite fraction (15 à 20%) des patients métaboliseurs ultra-rapides porte des duplications. Il existe donc, de façon majoritaire, d'autres mécanismes responsables du phénotype ultra-rapide (mutations activatrices dans les séquences codantes ou dans le promoteur...).

Une étude s'est intéressée au génotype de patients métaboliseurs ultra-rapides ne présentant pas de duplication (Løvlie *et al.*, 2001). Il a été mis en évidence chez ces patients la présence d'un SNP, le c.31G>A, et qui n'est retrouvé que dans l'allèle *CYP2D6**35. Les formes hétérozygotes et homozygotes de ce variant semblent avoir des conséquences sur le phénotype et sont plus représentées chez les patients métaboliseurs ultra-rapides, par rapport à des patients normaux.

Plus tard, la fréquence de l'allèle *35 a été déterminée chez 58 patients dépressifs considérés comme ultra-rapides et les résultats obtenus montrent la présence d'au moins un allèle *CYP2D6**35 dans 13,8% des cas (8/58), avec 12,1% de formes hétérozygotes (7/58) et 1,7% de formes homozygotes (1/58) (Müller *et al.*, 2003). Ces valeurs sont beaucoup plus élevées que celles obtenues lors de nos expériences, puisque sur les 116 ADN testés, seulement 4,3% présentaient au moins un allèle *35. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les 116 ADN testés ne provenaient pas d'une population spécifique d'ultra-rapides mais de la population générale.

La comparaison de nos résultats et de ceux de l'étude de Müller *et al.* (2003) peut être réalisée par un test statistique du X^2 . L'odd ratio, calculé avec ces données, est de 3,55 ($p < 0.1$). Cela signifie que les patients présentant au moins un allèle *35 ont 3,55 fois plus de risque de présenter un métabolisme ultra-rapide, par rapport à ceux qui n'ont aucun allèle *35. Ces données confirment donc l'hypothèse décrite dans la littérature selon laquelle l'allèle *35 serait lié au métabolisme ultra-rapide du *CYP2D6*.

Afin de mieux comprendre les mécanismes génétiques aboutissant au phénotype UM, des études se sont intéressées à d'autres SNPs et notamment au c.-1584C>G situé dans le promoteur. Il est à noter que ce polymorphisme a été trouvé par deux approches différentes

qui ont porté sur le phénotype IM et sur le phénotype UM, ce qui indique qu'il peut avoir un rôle pour les deux phénotypes (Raimundo *et al.*, 2000 ; Løvlie *et al.*, 2001).

Même si le génotype est de mieux en mieux déterminé, grâce aux avancées techniques, son lien direct avec le phénotype reste toujours complexe. Pour les allèles les plus communs, les informations de phénotype ont été obtenues à partir des études *in vivo* de corrélation phénotype-génotype, des études *in vitro* sur des échantillons de foie humain, ou à l'aide systèmes recombinants (Evert *et al.*, 1997 ; Leathart *et al.*, 1998 ; Gibbs *et al.*, 2006). Pour un certain nombre de variants plus rares, aucune information de phénotype n'est encore disponible.

Les résultats des tests génétiques ont l'avantage de ne pas être influencés par des facteurs environnementaux. Toutefois, dans le génotypage, il faut aussi accepter un niveau d'incertitude, certes faible mais inévitable, puisque toutes les mutations ne sont pas connues. Ceci est particulièrement pertinent pour les populations les moins bien étudiées.

La pharmacocinétique donne une idée du phénotype mais la corrélation avec le génotype n'est pas toujours évidente. D'une part, parce que le phénotype, associé aux isoformes les moins fréquents du *CYP2D6*, n'a pas été déterminé. D'autre part, il existe des facteurs contributifs qui rendent, dans certains cas, la détermination du phénotype difficile.

Un des inconvénients du phénotypage est la possibilité d'inhibition de l'enzyme par des médicaments co-administrés ou par des constituants alimentaires.

L'administration concomitante de médicaments ou de substrats du *CYP2D6* peut provoquer des interactions pharmacocinétiques et notamment une inhibition de celui-ci. La plupart des substrats et des inhibiteurs présentant une haute affinité pour l'enzyme *CYP2D6* peuvent entraîner un changement dans le ratio métabolique (MR). Certains de ces inhibiteurs sont mêmes assez forts pour changer l'apparent phénotype du patient, un phénomène connu sous le nom de « phenocopying in vivo » (Ebner & Eichelbaum, 1993). Cela peut entraîner le passage d'un phénotype EM à un IM ou même à un PM (Nielsen *et al.*, 1990 ; Gardiner & Begg, 2006 ; Saladores *et al.*, 2013).

Des études *in vitro* puis *in vivo* ont révélé l'existence d'une inhibition du *CYP2D6* par la méthadone à dose thérapeutique (Wu *et al.*, 1993 ; Shiran *et al.*, 2003). En effet, après administration de substrats du *CYP2D6* chez des patients sous TMM, il a été observé une discordance entre les génotypes et les phénotypes associés. Les résultats montraient une

proportion de phénotype PM bien plus forte que les données présentes dans la littérature (Wu *et al.*, 1993). Le fort pourcentage de PM chez des patients sous TMM est corrélé avec une inhibition de l'activité du CYP2D6 par la méthadone.

Le cytochrome 2D6 étant impliqué dans le métabolisme de nombreux médicaments, notamment les antidépresseurs, fréquents chez des patients addicts ou anciens addicts, la diminution de l'activité de l'enzyme influencera le niveau d'efficacité et de toxicité de ces médicaments.

L'état physiopathologique du patient est également un facteur à prendre en compte dans la détermination du phénotype. Un patient dont les fonctions hépatiques seraient altérées est un facteur supplémentaire d'une métabolisation défectueuse de la méthadone et des autres médicaments métabolisés par le CYP2D6.

En fonction des résultats du phénotypage et du génotypage, il est conseillé en général d'adapter les doses de méthadone en les augmentant pour les porteurs de gènes avec un gain de fonction (duplications, SNPs) et en les diminuant pour ceux qui sont porteurs de gènes avec un déficit de fonction. La question posée est celle de l'individualisation des thérapeutiques en fonction du patrimoine génétique de chaque patient. Pour mettre en place l'indication du génotypage chez des patients allant débiter un TMM, il faut une technique de biologie moléculaire fiable, reproductible, facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. Pour expliquer un métabolisme ultra-rapide du CYP2D6, une seule technique n'est pas suffisante, car il existe plusieurs mécanismes moléculaires aboutissant à ce type de phénotype. La MLPA et la HRM sont deux approches complémentaires mais elles n'expliqueraient que 20 à 30% des métaboliseurs ultra-rapides. Le problème posé par ce phénotype est qu'on n'en connaît pas tous les mécanismes et donc qu'il n'est pas possible pour l'instant de comprendre ce qui se passe dans la majorité des cas de métabolisme ultra-rapide. Le génotypage bien qu'utilisé dans de nombreuses pathologies n'est pour l'instant pas dans les recommandations de l'instauration d'un TMM.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ma thèse a réussi à atteindre les objectifs fixés au départ, soit la mise au point et la mise en place d'une méthode de biologie moléculaire simple, efficace et peu coûteuse pour évaluer les polymorphismes du *CYP2D6* responsables d'un métabolisme ultra-rapide, et notamment les variations de type CNVs et SNPs. La MLPA et la HRM sont déjà implantées parmi les techniques de routine dans l'évaluation des variations génétiques. Cependant, même si ces techniques ont prouvé leur efficacité, elles restent pour l'instant insuffisantes pour expliquer la relation génotype-phénotype chez de nombreux patients.

La difficulté pour prédire le phénotype métaboliseur ultra-rapide à l'aide du génotypage reste encore bien présente, du fait d'un faible taux de corrélation clinique. Interpréter le phénotype à partir du génotype est de plus en plus complexe, compte tenu du nombre croissant d'allèles du *CYP2D6* et de leurs gammes d'activités très différentes et parfois inconnues. Cette complexité constitue un défi pour la recherche, où le génotypage est considéré comme un outil pour personnaliser la thérapie médicamenteuse.

L'identification des mécanismes moléculaires responsables du phénotype métaboliseur ultra-rapide est primordiale afin de mieux les rechercher, par des techniques de biologie moléculaire fiables et robustes, qui existent actuellement. Il est possible d'étendre la recherche de polymorphismes à d'autres gènes, susceptibles d'être impliqués dans le métabolisme ultra-rapide, par des techniques récentes comme le séquençage nouvelle génération (NGS). Le *CYP2D6* est une cible de choix en raison de son implication dans le métabolisme de nombreux médicaments (opiacés, antidépresseurs, β -bloquants...) et de son impact clinique et posologique, relatif à son activité enzymatique.

ANNEXES

Annexe 1 : SALSA MLPA P128-B2 Cytochrome P450 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA	
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation	
100	X-fragment: Specific for the X chromosome	
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome	
127	Reference probe 00797-L00093	5q31
132	GSTT1 probe 04755-L16390	22q11 / Exon 1
136	CYP1B1 probe 08149-L08029	2p22 / Exon 1
142	CYP3A5 probe 09535-L16389	7q21 / Exon 12a
148	CYP2E1 probe 07898-L07634	10q26 / Exon 8
154	CYP3A4 probe 09530-L09940	7q21 / Exon 6
160	Reference probe 04690-L04068	1p36
166	Reference probe 04111-L03471	9q34
172	GSTP1 probe 06819-L07011	11q13 / Exon 4
178	CYP1B1 probe 08151-L16393	2p22 / Exon 3
185	CYP2A6 probe 08031-L07812	19q13 / Exon 5
190	CYP2A6 probe 09517-L09927	19q13 / Exon 1
196	CYP2D6 probe 04325-L07013	22q13 / Exon 1
202	CYP2B6 probe 09522-L09932	19q13 / Exon 4
208	CYP1A2 probe 07901-L07637	15q24 / Exon 2
214	Reference probe 08757-L08797	10q21
221	CYP2C9 probe 05848-L07012	10q23 / Exon 1
226	CYP2C9 probe 09524-L09934	10q23 / Exon 9
232	CYP2D6 probe 09528-L09938	22q13 / Exon 6
238	CYP2E1 probe 07897-L07633	10q26 / Exon 6
244	CYP2A6 probe 09518-L09928	19q13 / Exon 2
250	CYP3A4 probe 09529-L09939	7q21 / Exon 1
256	CYP1A1 probe 07362-L06407	15q24 / Exon 3
264	CYP3A5 probe 09533-L09943	7q21 / Exon 2c
268	Reference probe 11120-L11808	1p32
274	CYP1A2 probe 07903-L07639	15q24 / Exon 7
280	Reference probe 13577-L15034	19p13
285	Reference probe 00824-L00970	3q25
292	CYP2C19 probe 09525-L09935	10q23 / Exon 2
299 +	CYP2D6 probe 04332-L03697	22q13 / Exon 5
306	Reference probe 07977-L07758	17q21
312	CYP2C19 probe 05677-L16394	10q23 / Exon 9
319 ¥	CYP2B6 probe 09521-L20817	19q13 / Exon 3
325	GSTM1 probe 06814-L16401	1p13 / Exon 3
332	CYP1A1 probe 06811-L16402	15q24 / Exon 2
338	CYP3A4 probe 09532-L16403	7q21 / Exon 13
346	CYP2A6 probe 09519-L16404	19q13 / Exon 3
355	CYP2C9 probe 05850-L05352	10q23 / Exon 7
364	GSTM1 probe 07895-L10846	1p13 / Exon 5
370	CYP2B6 probe 09520-L16750	19q13 / Exon 2
377 ¥	CYP2E1 probe 02394-L01842	10q26 / Exon 5
385	GSTT1 probe 04756-L16405	22q11 / Exon 5
394	CYP2D6 probe 09527-L16406	22q13 / Exon 4
401	Reference probe 03081-L07411	8q23
409	CYP1A2 probe 07902-L07638	15q24 / Exon 4
418	CYP2C19 probe 05676-L05221	10q23 / Exon 6
429 ¥	CYP1A1 probe 06810-L21542	15q24 / Exon 1
436	CYP2D6 probe 04327-L03680	22q13 / downstream
445	CYP3A5 probe 09534-L09944	7q21 / Exon 5b
454	Reference probe 09423-L09672	11q13
463	CYP2C9 probe 14698-L16349	10q23 / Exon 8

Annexe 2 : Protocole de la MLPA

Étape 3	Préparation des prémix d'hybridation.	
Salle pré PCR	 	 
Attention certaines techniques se font en demi volume. Voir les imprimés de fabrication des kits MLPA spécifiques de chaque maladie ou chaque gène.		

Préparer autant de mix d'hybridation que de kits utilisés :

- Pour chaque échantillon, préparer le(s) prémix d'hybridation contenant
 - 1,5 µL de mix de sondes SALSA (bouchon noir) préalablement homogénéisé.
 - 1,5 µL de tampon MLPA (bouchon jaune) préalablement homogénéisé.
- Vortexer le mélange

Étape 4	Dilution de l'ADN.	
Salle d'extraction/dilution des ADN	 	 
Attention certaines techniques se font en demi volume. Voir les imprimés de fabrication des kits MLPA spécifiques de chaque maladie ou chaque gène.		

- Diluer l'échantillon d'ADN à la concentration adéquate dans du TE 10:0,1.
- Déposer dans tube PCR 0,2 mL, :
 - 5µL d'ADN précédemment dilué (soit entre 50 et 250ng)
- Faire un blanc avec du TE 10:0,1.

Étape 5	Dénaturation de l'ADN	
Salle MLPA	 	 

- Chauffer à 98°C pendant le temps adéquat (Voir 9166-MO-G MLPA Tous secteurs)
- refroidir à 25°C : Programme de dénaturation

Biorad ou 9700 Salle MLPA
PROGRAMME MLPA dénat
98°C pendant 5 min
25°C à l'∞

Étape 6	Hybridation de l'ADN (Ajout du prémix d'hybridation à la dilution d'ADN dénaturé)	
Salle MLPA	 	 
Attention certaines techniques se font en demi volume. Voir les imprimés de fabrication des kits MLPA spécifiques de chaque maladie ou chaque gène.		

- Ajouter les 3µL de prémix (préparé à l'étape 3) dans chaque tube
- Mélanger soigneusement par aspiration refoulement
- Lancer le programme **MLPA HYBRIDATION**

Biorad ou 9700 Salle MLPA
MLPA HYBRI
1 min à 95°C
60°C à l'∞ (entre 16h et 20h)

Attention 60°C est programmé « for ever ». Laisser une indication pour signaler qu'il ne faut pas arrêter le thermocycleur pendant la nuit.

Étape 7	Préparation du mix ligase-65	
Salle préPCR	 	 
Attention certaines techniques se font en demi volume. Voir les imprimés de fabrication des kits MLPA spécifiques de chaque maladie ou chaque gène.		

La préparation doit se faire moins d'une heure avant l'utilisation et doit être conservée sur la glace.

- Préparer un prémix en mélangeant pour le nombre d'échantillon à analyser +1 (ou 2 en fonction du nombre de tubes de la série)
 - 3 µL de tampon A de ligase-65 (bouchon transparent)
 - 3 µL de tampon B de ligase-65 (bouchon blanc)
 - et 25 µL d'eau.
- Ajouter 1 µL de ligase-65 (bouchons verts)
- Mélanger à nouveau par aspiration/refoulement
- Stocker sur glace.

Attention: Ne pas vortexer les solutions d'enzymes.

Étape 8	Préparation du mix de polymérase	
Salle préPCR	 	 
Attention certaines techniques se font en demi volume. Voir les imprimés de fabrication des kits MLPA spécifiques de chaque maladie ou chaque gène.		

Afin de préserver le flux de non contamination, l'étape de préparation de polymérase est réalisée avant l'étape de ligation.

La préparation doit se faire moins d'une demi-heure avant l'utilisation et doit être conservée sur la glace.

- Vortexer le mix **PRIMER SALSA PCR**
- Préparer un mix en mélangeant pour le nombre d'échantillon à analyser +1 (ou 2 ou 3)
 - 2 µL de **PRIMER PCR SALSA FAM** (*tube+bouchon marrons – nouveaux kits*)
 - 0.5 µL de polymérase **SALSA** (bouchon orange).
 - 7,5 µL d'eau
- Bien mélanger par aspiration/refoulement
- Stocker sur glace.

Étape 9	Réaction de ligation (Ajout du mix ligase au mix d'hybridation)	
Salle MLPA	 	 
Attention certaines techniques se font en demi volume. Voir les imprimés de fabrication des kits MLPA spécifiques de chaque maladie ou chaque gène.		

Après l'étape d'hybridation (étape 6)

- Réduire la température du thermocycleur à 54°C : Prog MLPA LIG.
- Quand il est à 54°C :
 - faire pause pour ouvrir le thermocycleur,
 - ajouter 32µL de mix Ligase-65 à chaque échantillon,
 - mélanger.

Attention la pause à 54°C dure 10 minutes

- Refermer et relancer le programme :

Biorad ou 9700 Salle MLPA

MLPA LIG

15 min à 54°C

5 min à 98°C

∞ à 20°C

Les produits de ligation peuvent être stockés à + 4°C jusqu'à une semaine. Pour des stockages plus longs, les congeler à -20°C.

Étape 10	Préparation de la réaction de PCR (Ajout du mix polymérase au produit de ligation)	
Salle MLPA	 	 
Attention certaines techniques se font en demi volume. Voir les imprimés de fabrication des kits MLPA spécifiques de chaque maladie ou chaque gène.		

- Ajouter dans chaque barrette de ligation, 10 µL de mix polymérase
- Mélanger par aspiration/refoulement.

Étape 11	Amplification par PCR	
Salle des thermocycleurs	 	 

- Mettre les tubes dans le thermocycleur 9700 et lancer le Programme MLPA PCR.

9700 Salle des thermocycleurs	
MLPA PCR	
95°C	30sec
60°C	30sec
72°C	1 min
72°C	20min
15°C	∞
X35	

Les produits de PCR peuvent être stockés à 4°C jusqu'à une semaine. Pour des stockages plus longs, les congeler à -20°C mais toujours à l'abri de la lumière.

Annexe 3 : Protocole de la HRM

Étape 1	Préparation du mixPCR.	
Salle de préparation des mix		

Se référer à la liste des conditions opératoire et à la feuille de calcul des mix PCR spécifiques de la maladie ou du gène.

Sur JANUS :

La répartition du mix (excepté pour les témoins) est réalisée sur l'automate JANUS : Voir le mode opératoire

9166-MO-ANA-REA-054 Répartition des mix PCR et addition des ADN pour HRM – Diluteur JANUS

Manuellement :

Le master mix Roche® est prêt à l'emploi.

- Sortir le master mix HRM et le MgCl₂ du congélateur
- Sortir les amorces
- Noter le numéro de lot du master mix sur la feuille de PCR
- Déposer 10 µL de mixPCR dans chaque puits

Étape 2	Addition de l'ADN.	
Salle de dilution des ADN ou salle de dépôt des ADN	 	

Se référer à la liste des conditions opératoire et à la feuille de calcul des mix PCR spécifiques de la maladie ou du gène.

- Centrifuger les plaques d'ADN à 4ng/µL

Sur JANUS :

La répartition des échantillons (excepté pour les témoins) est réalisée sur l'automate JANUS : Voir le mode opératoire

9166-MO-ANA-REA-054 Répartition des mix PCR et addition des ADN pour HRM – Diluteur JANUS

Manuellement :

Mettre dans chaque puits 5 µL d'ADN à amplifier
(Si deux plaques : utiliser les mêmes cônes)

Déposer les témoins positifs dans les puits F12,G12 et H12

Fermer la plaque avec les bouchons en utilisant le peigne
Centrifuger la plaque quelques secondes pour faire tomber les gouttes

Étape 3	Passage sur Light Cycler.	
Salle des thermocycleurs		

1-Programme HRM

Le programme est constitué de deux étapes :

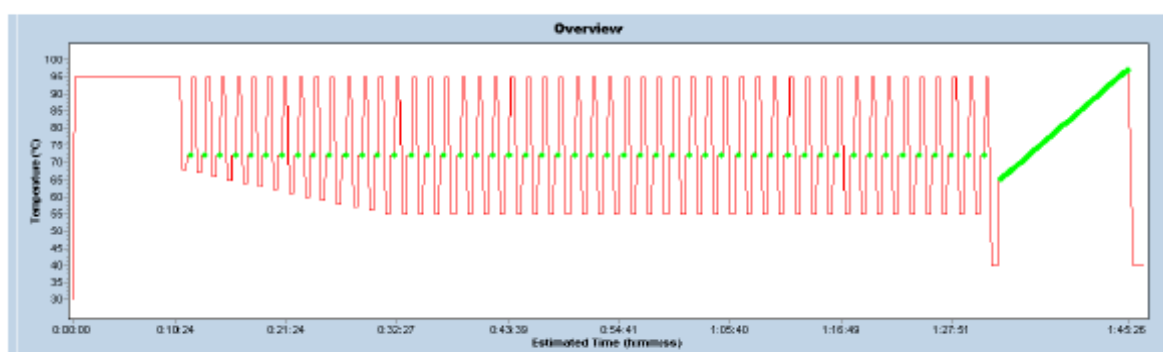
- ☞ PCR Touch down
- ☞ Fusion

Le programme peut être réalisé entièrement sur le LC 480,

ou

l'étape "Touch down" peut être réalisée sur un PTC 200 et l'étape de fusion sur le LC 480

Programme HRM	
LC 480 Programme PCR 50 cycles Touch down 55	PTC 200 Programme BRCA50 ou BRCA55
X 13 95°C 10 sec 68°C 15 sec ↓ -1°C/cycle 55°C 15 sec 72°C 15 sec X 37 95°C 10 sec 55°C 15 sec 72°C 15 sec	94°C 2 min X 35 94°C 30 sec 55°C ou 50°C 30 sec 72°C 45 sec 72°C 10 min 20°C ∞
Fusion 95°C 1 sec 40°C 30 sec 65°C 1 sec 65°C ↓ 25 mesures /°C 97°C 40°C ∞ <i>A suivre</i> <i>A lancer</i>	



Annexe 4 : Protocole du séquençage

Etape 1	Purification des produits de PCR
Salle post PCR ou plate forme de séquençage	   

Cette étape permet de purifier les produits d'amplification de PCR pour effectuer ensuite la réaction de séquence.

L'enzyme utilisée a une activité exonucléasique (EXO) qui permet d'éliminer les amorces libres et une activité phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) qui enlève les phosphates en 5' des dNTP et rend donc leur incorporation dans l'ADN impossible.

Cette purification enzymatique nécessite deux incubations successives :

- incubation à 37°C permettant l'action des enzymes
- incubation à 80°C permettant la dénaturation des enzymes

Le produit ainsi purifié est ensuite directement utilisable pour la réaction de séquence.

Matériel et réactifs nécessaires

- Thermocycleurs
- Thermosoudeuse
- Centrifugeuse à micro plaques, mini centrifugeuse à tube
- Micro plaques 96 puits
- Tubes de réaction de 0,2 mL

- Tube «EXOSTAR»

Purification enzymatique des produits d'amplification

- Dans une plaque ou une barrette, distribuer :

	Séquençage 2 brins	Séquençage 1 brin
Produit d'amplification à purifier	5 µL	2 µL
Tube ExoStar	1 µL	0.5 µL
Eau	0 µL	0.5 µL

- Couvrir la plaque avec un film thermosoudé ou un tapis gris (Attention au sens : picots en haut)
- Centrifuger rapidement la plaque,
- Lancer un programme EXO sur PCT200 ou sur 9700/9800

PROGRAMME : EXO

37°C pendant 15 min
80°C pendant 15 min
20°C à l'∞

- Recentrifuger rapidement la plaque.

A la fin de la purification :

- Procéder à l'étape suivante ou
 - Placer les tubes à +4°C pour une conservation <48h
 - Placer les tubes à -20°C pour une conservation >48h
- } en attendant l'étape suivante

Étape 2	Préparation des réactions de séquence		
Salle post PCR ou plate-forme de séquençage			 

Matériel et réactifs nécessaires

- Centrifugeuse
- Thermocycleurs,
- Thermosoudreuse - films
- Tapis de protection pour microplaque
- Microplaque adaptée au thermocycleur
- Plaques 96 puits PCR classique ou tube 0,2ml classique
- Bouchons

- Amorces
- Eau stérile en ampoule
- Big Dye Terminator Cycle Sequencing
- Tampon 5X sequencing buffer
- Plasmide pGEM3Z
- Amorce 21M13

Préparation des réactions de séquence

- Préparer des dilutions des amorces de séquence à 1,6 pmoles/μL dans de l'eau stérile.

Attention : Utiliser de préférence le thermocycleur 9800
Choisir les tubes et la plaque correspondant au thermocycleur utilisé.

- Préparer dans une plaque pour chaque réaction de séquence le mélange du tableau suivant :
- Préparer également une réaction de séquence d'un témoin plasmide pGEM3Z avec l'amorce standard -21M13 :

	Echantillon	Témoin
Big Dye Terminator, version 1.1	1 μL	1 μL
Tampon 5X sequencing buffer	2 μL	2 μL
Amorce à 1,6 picomoles/μL	1 μL	1 μL (21M13 à 0,8 pM)-
Produit PCR	1 à 6 μL selon concentration. Voir CO spécifiques	1 μL (pGEM3Z)
H ₂ O stérile en ampoule	QSP 10 μL	5 μL

- Couvrir la plaque avec un film thermosoudé, un tapis (cover plate) ou avec des bouchons pour les barrettes.
- Centrifuger rapidement la plaque,
- Lancer le programme sur PTC200 : FASTDYET
ou sur 9700 OU 9800 : DYETERFAST (dossier seq) :

PROGRAMME DE RÉACTION DE SÉQUENCE

96°C 1 min	} X 25
96°C 10sec	
50°C 5sec	
60°C 1min15	
20°C ∞	

- Stocker la plaque identifiée à l'abri de la lumière à +4°C en attente de purification (2 semaines maximum).

Étape 3	Purification des réactions de séquence	
Salle post PCR	 	 Porter un masque ou utiliser la hotte pour la manipulation du formamide.

Cette étape a pour but de purifier par filtration sur gel les produits de réaction de séquences.

La résine Sephadex G50 utilisée permet de dessaler les échantillons et d'éliminer les dNTP et ddNTP fluorescents non incorporés et les amorces de PCR en excès.

La limite d'exclusion de la résine G50 est d'environ 20 bases.

La plaque 96 puits Multiscreen est utilisée comme support inerte de la résine G50.

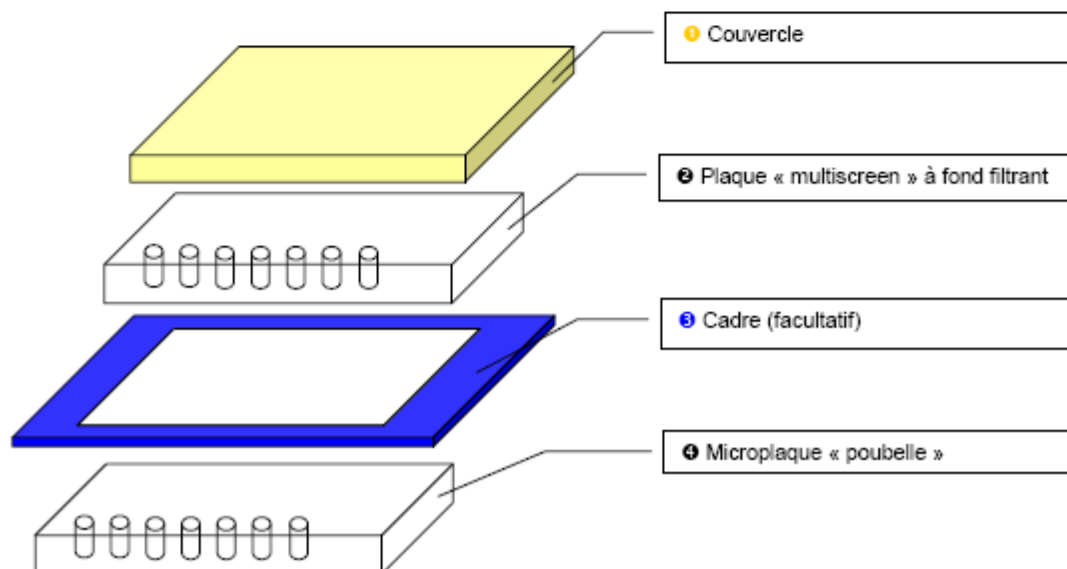
Le numéro de lot des plaques Multiscreen utilisées partiellement doit être inscrit sur la plaque et sur le couvercle. Au changement de lot, jeter les plaques partiellement utilisées en attente.

Matériel et réactifs nécessaires

- ✓ Centrifugeuse
- ✓ Micro plaque à membrane filtrante (Multiscreen de MILLIPORE),
- ✓ Micro plaque "réceptacle" fond conique
- ✓ Gel sephadex G50 Voir [MO-ANA-REA-015 répertoire des produits préparés au laboratoire.](#)

Purification des réactions de séquence

- Préparer le montage suivant :



- Un montage équivalent doit permettre d'équilibrer les charges lors des centrifugations.

1

- Bien homogénéiser le gel G-50
- Distribuer 300 μ L de G-50 dans les puits de la micro plaque à fond filtrant ②.

2

- Mettre le couvercle.
- Centrifuger 3 minutes à 2000 tr/min.
- Jeter le contenu de la plaque poubelle ④

3

- Bien homogénéiser le gel G-50
- Distribuer de nouveau 300 μ L de G-50 dans les puits de la plaque à fond filtrant ②,
- Équilibrer l'ensemble.

4

- Centrifuger 3 minutes à 2000 tr/min.

5



Réaliser cette opération sous la hotte ou porter un masque.

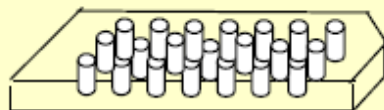
- Répartir 10 μ L de formamide désionisé dans les puits d'une microplaque identifiée propre destinée à recevoir les réactions de

Position A1 en haut à gauche

Encoche en haut à droite

Attention :

- Utiliser une microplaque Thermo-Fast Detection Plate Ref :AB-1100



- Remplir de formamide tous les puits de la plaque correspondants aux positions du run de séquence.

6

- Changer la microplaque inférieure « poubelle » ④ et la remplacer par la microplaque contenant le formamide ⑤.

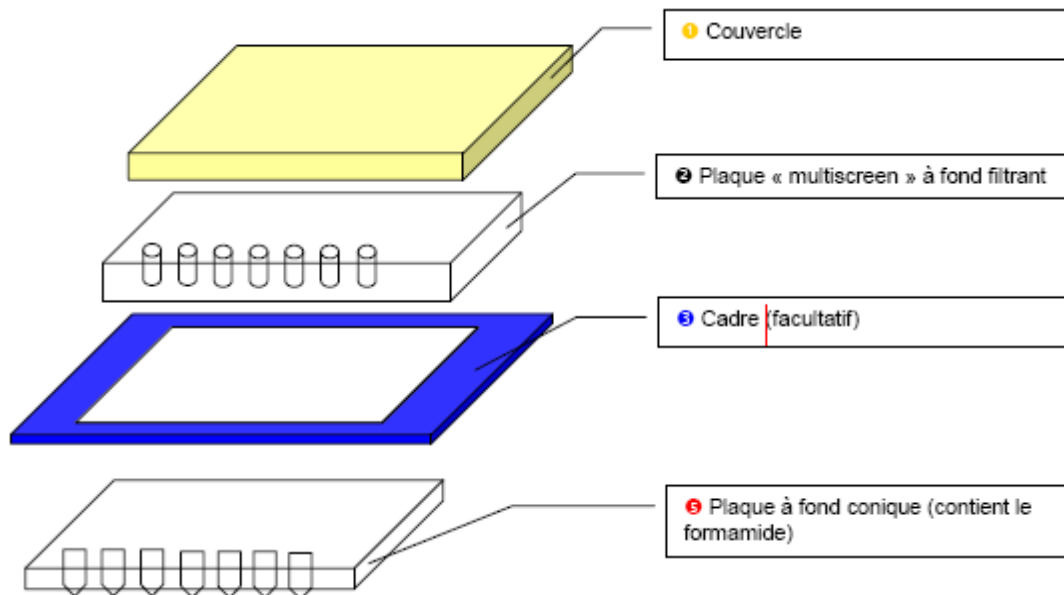
7

- Charger la réaction de séquence **bien au centre du puits** de la plaque à fond filtrant ②.
- Surtout **ne pas déposer** la réaction **le long des parois**

Attention : Cette étape est primordiale.

8

- Fixer éventuellement l'ensemble du montage au moyen d'un ruban adhésif
- Attention : Le montage doit être parfaitement étanche.**
- Centrifuger 3 minutes à 2000 tr/min avec les couvercles.



- Stocker la plaque ⑤ identifiée à l'abri de la lumière à +4°C en attente de l'injection sur le séquenceur (1 semaine maximum).
- Jeter la plaque multiscreen entièrement utilisée (les plaques incomplètes sont gardées pour une autre purification)

Étape 4	Injection des réactions de séquence – Séquenceur 3130		
Plate forme de séquençage			 

Créer la feuille de route et la transférer sur 3130 Séquençage : 9166- MO-ANA-RÉA-047 – Création/transfert de la feuille de route et récupération des données de génotypage/séquençage sur 3130.
 Se référer au mode opératoire de la plate forme de séquençage : 9167-MO-ANA-RÉA – Injection des réactions de séquences

Étape 5	Analyse des données	
Bureau		

Les séquences obtenues sont analysées à l'aide du logiciel « seqscape » 9166-MO-ANA-REA-029 – Analyse des données sur Seqscape

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, B., and Adithan (2001). Genetic polymorphism of CYP2D6. *Indian J. Pharmacol.* 33, 147.
- Adinoff, B. (2004). Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harv. Rev. Psychiatry* 12, 305–320.
- Agúndez, J.A., Ledesma, M.C., Ladero, J.M., and Benítez, J. (1995). Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clin. Pharmacol. Ther.* 57, 265–269.
- Aklillu, E., Persson, I., Bertilsson, L., Johansson, I., Rodrigues, F., and Ingelman-Sundberg, M. (1996). Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 441–446.
- Alache, Besner, Buri, Leblanc, and Lesne (1990). *Traité de biopharmacie et pharmacocinétique*, deuxième édition (Paris).
- Anchersen, K., Clausen, T., Gossop, M., Hansteen, V., and Waal, H. (2009). Prevalence and clinical relevance of corrected QT interval prolongation during methadone and buprenorphine treatment: a mortality assessment study. *Addiction* 104, 993–999.
- Ansermot, N., Albayrak, O., Schläpfer, J., Crettol, S., Croquette-Krokar, M., Bourquin, M., Déglon, J.-J., Faouzi, M., Scherbaum, N., and Eap, C.B. (2010). Substitution of (R,S)-methadone by (R)-methadone: Impact on QTc interval. *Arch. Intern. Med.* 170, 529–536.
- Assemblée parlementaire (2007). *Politique de santé publique et lutte contre la drogue*, volume VII.
- Bathum, L., Johansson, I., Ingelman-Sundberg, M., Hørder, M., and Brøsen, K. (1998). Ultrarapid metabolism of sparteine: frequency of alleles with duplicated CYP2D6 genes in a Danish population as determined by restriction fragment length polymorphism and long polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics* 8, 119–123.
- Beaulieu, and Lambert (2010). *Précis de Pharmacologie, du fondamental à la clinique*.
- Beaune, P. (1998). Cytochromes P450 humains : applications en toxicologie. *Médecine Thérapeutique* 4, 493–499.
- Bell, J.R., Butler, B., Lawrance, A., Batey, R., and Salmelainen, P. (2009). Comparing overdose mortality associated with methadone and buprenorphine treatment. *Drug Alcohol Depend.* 104, 73–77.
- Bergmann, T.K., Bathum, L., and Brosen, K. (2001). Duplication of CYP2D6 predicts high clearance of desipramine but high clearance does not predict duplication of CYP2D6. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 57, 123–127.

Bernard, S., Neville, K.A., Nguyen, A.T., and Flockhart, D.A. (2006). Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. population: clinical implications. *Oncologist* 11, 126–135.

Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjöqvist, F., Aberg-Wistedt, A., Humble, M., Johansson, I., Lundqvist, E., and Ingelman-Sundberg, M. (1993). Molecular basis for rational megaprescribing in ultrarapid hydroxylators of debrisoquine. *Lancet* 341, 63.

Black, J.L., Walker, D.L., O’Kane, D.J., and Harmandayan, M. (2012). Frequency of Undetected CYP2D6 Hybrid Genes in Clinical Samples: Impact on Phenotype Prediction. *Drug Metab. Dispos.* 40, 111–119.

Bock, K.W., Schrenk, D., Forster, A., Griesse, E.U., Mörike, K., Brockmeier, D., and Eichelbaum, M. (1994). The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine, and paracetamol as probes. *Pharmacogenetics* 4, 209–218.

Bourel, M., and Ardaillou, R. (2006). *Pharmacogénétique et pharmacogénomique* (Paris).
Bradford, L.D. (2002). CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 3, 229–243.

Broly, F., and Meyer, U.A. (1993). Debrisoquine oxidation polymorphism: phenotypic consequences of a 3-base-pair deletion in exon 5 of the CYP2D6 gene. *Pharmacogenetics* 3, 123–130.

Brunton, Chabner, and Knollman (2010). *Goodman and Gillman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12e.

Cai, W.-M., Nikoloff, D.M., Pan, R.-M., de Leon, J., Fanti, P., Fairchild, M., Koch, W.H., and Wedlund, P.J. (2006). CYP2D6 genetic variation in healthy adults and psychiatric African-American subjects: implications for clinical practice and genetic testing. *Pharmacogenomics J.* 6, 343–350.

Cesaro, Raimundo, and Klein (2003). CYP2D6 “Intermediate Metabolizer” phenotype as a consequence of genetically determined alternative splicing. *Chem.Listy*.

Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5274–5278.

Chida, M., Ariyoshi, N., Yokoi, T., Nemoto, N., Inaba, M., Kinoshita, M., and Kamataki, T. (2002). New allelic arrangement CYP2D6*36 x 2 found in a Japanese poor metabolizer of debrisoquine. *Pharmacogenetics* 12, 659–662.

Chou, W.-H., Yan, F.-X., Robbins-Weilert, D.K., Ryder, T.B., Liu, W.W., Perbost, C., Fairchild, M., de Leon, J., Koch, W.H., and Wedlund, P.J. (2003). Comparison of two CYP2D6 genotyping methods and assessment of genotype-phenotype relationships. *Clin. Chem.* 49, 542–551.

Clement (2011). Mise au point et validation d’une méthode quantitative pour évaluer le

nombre de copies de régions chromosomiques spécifiques (CNV) dans de grands échantillons.

De los Cobos, J., Valero, S., Haro, G., Fidel, G., Escuder, G., Trujols, J., and Valderrama, J.C. (2002). Development and psychometric properties of the Verona Service Satisfaction Scale for methadone-treated opioid-dependent patients (VSSS-MT). *Drug Alcohol Depend.* 68, 209–214.

Connors, W.J. (2009). Methadone maintenance treatment : a study of patients' perspective in Pince George, British Columbia.

Crettol, S., Déglon, J.-J., Besson, J., Croquette-Krokkar, M., Gothuey, I., Hämmig, R., Monnat, M., Hüttemann, H., Baumann, P., and Eap, C.B. (2005). Methadone enantiomer plasma levels, CYP2B6, CYP2C19, and CYP2C9 genotypes, and response to treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 78, 593–604.

Dahl, M.L., Yue, Q.Y., Roh, H.K., Johansson, I., Säwe, J., Sjöqvist, F., and Bertilsson, L. (1995). Genetic analysis of the CYP2D locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects. *Pharmacogenetics* 5, 159–164.

Daly, A.K., Brockmöller, J., Broly, F., Eichelbaum, M., Evans, W.E., Gonzalez, F.J., Huang, J.D., Idle, J.R., Ingelman-Sundberg, M., Ishizaki, T., et al. (1996a). Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics* 6, 193–201.

Daly, A.K., Fairbrother, K.S., Andreassen, O.A., London, S.J., Idle, J.R., and Steen, V.M. (1996b). Characterization and PCR-based detection of two different hybrid CYP2D7P/CYP2D6 alleles associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 6, 319–328.

Dayer, P., Gasser, R., Gut, J., Kronbach, T., Robertz, G.M., Eichelbaum, M., and Meyer, U.A. (1984). Characterization of a common genetic defect of cytochrome P-450 function (debrisoquine-sparteine type polymorphism)--increased Michaelis is Constant (Km) and loss of stereoselectivity of bufuralol 1'-hydroxylation in poor metabolizers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 374–380.

Dayer, P., Leemann, T., and Striberni, R. (1989). Dextromethorphan O-demethylation in liver microsomes as a prototype reaction to monitor cytochrome P-450 db1 activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 45, 34–40.

Distlerath, L.M., Reilly, P.E., Martin, M.V., Davis, G.G., Wilkinson, G.R., and Guengerich, F.P. (1985). Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* 260, 9057–9067.

Dole, V.P. (1988). Implications of methadone maintenance for theories of narcotic addiction. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 260, 3025–3029.

Drummer, O.H., Opeskin, K., Syrjanen, M., and Cordner, S.M. (1992). Methadone toxicity causing death in ten subjects starting on a methadone maintenance program. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 13, 346–350.

- Ebner, T., and Eichelbaum, M. (1993). The metabolism of aprindine in relation to the sparteine/debrisoquine polymorphism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 35, 426–430.
- Eichelbaum, M., Spannbrucker, N., and Dengler, H.J. (1975). Proceedings: N-oxidation of sparteine in man and its interindividual differences. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 287 Suppl, R94.
- Eichelbaum, M., Baur, M., Dengler, H., Osikowska-Evers, B., Tieves, G., Zekorn, C., and Rittner, C. (1987). Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 23, 455–458.
- Eiermann, B., Edlund, P.O., Tjernberg, A., Dalén, P., Dahl, M.L., and Bertilsson, L. (1998). 1- and 3-hydroxylations, in addition to 4-hydroxylation, of debrisoquine are catalyzed by cytochrome P450 2D6 in humans. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 26, 1096–1101.
- Endrizzi, K., Fischer, J., Klein, K., Schwab, M., Nüssler, A., Neuhaus, P., Eichelbaum, M., and Zanger, U.M. (2002). Discriminative quantification of cytochrome P4502D6 and 2D7/8 pseudogene expression by TaqMan real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 300, 121–131.
- Evert, B., Eichelbaum, M., Haubruck, H., and Zanger, U.M. (1997). Functional properties of CYP2D6 1 (wild-type) and CYP2D6 7 (His324Pro) expressed by recombinant baculovirus in insect cells. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 355, 309–318.
- Farrell, M., Howes, S., Bebbington, P., Brugha, T., Jenkins, R., Lewis, G., Marsden, J., Taylor, C., and Meltzer, H. (2001). Nicotine, alcohol and drug dependence and psychiatric comorbidity. Results of a national household survey. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 179, 432–437.
- Ferrari, A., Coccia, C.P.R., Bertolini, A., and Sternieri, E. (2004). Methadone--metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 50, 551–559.
- Fonseca, F., de la Torre, R., Díaz, L., Pastor, A., Cuyàs, E., Pizarro, N., Khymenets, O., Farré, M., and Torrens, M. (2011). Contribution of cytochrome P450 and ABCB1 genetic variability on methadone pharmacokinetics, dose requirements, and response. *PloS One* 6, e19527.
- Gaedigk, A., Blum, M., Gaedigk, R., Eichelbaum, M., and Meyer, U.A. (1991). Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 943–950.
- Gaedigk, A., Ndjountché, L., Divakaran, K., Dianne Bradford, L., Zineh, I., Oberlander, T.F., Brousseau, D.C., McCarver, D.G., Johnson, J.A., Alander, S.W., et al. (2007). Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene locus heterogeneity: characterization of gene duplication events. *Clin. Pharmacol. Ther.* 81, 242–251.
- Gaedigk, A., Frank, D., and Fuhr, U. (2009). Identification of a novel non-functional CYP2D6 allele, CYP2D6*69, in a Caucasian poor metabolizer individual. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 65, 97–100.
- Gaedigk, A., Jaime, L.K.M., Bertino, J.S., Berard, A., Pratt, V.M., Bradfordand, L.D., and

- Leeder, J.S. (2010a). Identification of Novel CYP2D7-2D6 Hybrids: Non-Functional and Functional Variants. *Front. Pharmacol.* 1.
- Gaedigk, A., Fuhr, U., Johnson, C., Bérard, L.A., Bradford, D., and Leeder, J.S. (2010b). CYP2D7-2D6 hybrid tandems: identification of novel CYP2D6 duplication arrangements and implications for phenotype prediction. *Pharmacogenomics* 11, 43–53.
- Gardiner, S.J., and Begg, E.J. (2006). Pharmacogenetics, Drug-Metabolizing Enzymes, and Clinical Practice. *Pharmacol. Rev.* 58, 521–590.
- Gerber, J.G., Rhodes, R.J., and Gal, J. (2004a). Stereoselective metabolism of methadone N-demethylation by cytochrome P4502B6 and 2C19. *Chirality* 16, 36–44.
- Gibbs, J.P., Hyland, R., and Youdim, K. (2006). Minimizing polymorphic metabolism in drug discovery: evaluation of the utility of in vitro methods for predicting pharmacokinetic consequences associated with CYP2D6 metabolism. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 34, 1516–1522.
- Gibier, L. (1999). *Prises en charge des usagers de drogues* (France: Doin editeurs).
- Glaeser, H., Drescher, S., Eichelbaum, M., and Fromm, M.F. (2005). Influence of rifampicin on the expression and function of human intestinal cytochrome P450 enzymes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 59, 199–206.
- Goldstein, R.Z., and Volkow, N.D. (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am. J. Psychiatry* 159, 1642–1652.
- Gonzalez, F.J., and Nebert, D.W. (1990). Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant “warfare”, molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet. TIG* 6, 182–186.
- Gonzalez, F.J., Skoda, R.C., Kimura, S., Umeno, M., Zanger, U.M., Nebert, D.W., Gelboin, H.V., Hardwick, J.P., and Meyer, U.A. (1988). Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 331, 442–446.
- Gough, A.C., Smith, C.A.D., Howell, S.M., Wolf, C.R., Bryant, S.P., and Spurr, N.K. (1993). Localization of the CYP2D Gene Locus to Human Chromosome 22q13.1 by Polymerase Chain Reaction, in Situ Hybridization, and Linkage Analysis. *Genomics* 15, 430–432.
- Griese, E.U., Zanger, U.M., Brudermanns, U., Gaedigk, A., Mikus, G., Mörike, K., Stüven, T., and Eichelbaum, M. (1998). Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* 8, 15–26.
- Griese, E.U., Asante-Poku, S., Ofori-Adjei, D., Mikus, G., and Eichelbaum, M. (1999). Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population. *Pharmacogenetics* 9, 715–723.
- Gu guen et al (2006). Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. 64.

- Guitart, X., Thompson, M.A., Mirante, C.K., Greenberg, M.E., and Nestler, E.J. (1992). Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *J. Neurochem.* 58, 1168–1171.
- Heim, M.H., and Meyer, U.A. (1992). Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics* 14, 49–58.
- Hiltunen, A.J., Beck, O., Hjemdahl, P., Liljeberg, P., Almström, U., Brodin, K., von Wachenfeldt, J., and Borg, S. (1999). Rated well-being in relation to plasma concentrations of l- and d-methadone in satisfied and dissatisfied patients on methadone maintenance treatment. *Psychopharmacology (Berl.)* 143, 385–393.
- Hoeven, T.A. van der, and Coon, M.J. (1974). Preparation and Properties of Partially Purified Cytochrome P-450 and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Cytochrome P-450 Reductase from Rabbit Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* 249, 6302–6310.
- Hope, B.T., Nye, H.E., Kelz, M.B., Self, D.W., Iadarola, M.J., Nakabeppu, Y., Duman, R.S., and Nestler, E.J. (1994). Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13, 1235–1244.
- Ingelman-Sundberg, M. (1998). Functional consequences of polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes. *Toxicol. Lett.* 102–103, 155–160.
- Ingelman-Sundberg, M. (1999). Duplication, multiduplication, and amplification of genes encoding drug-metabolizing enzymes: evolutionary, toxicological, and clinical pharmacological aspects. *Drug Metab. Rev.* 31, 449–459.
- Ingelman-Sundberg, M. (2001). Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat. Res.* 482, 11–19.
- Ingelman-Sundberg, M. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 5, 6–13.
- Ingelman-Sundberg, M., and Oscarson, M. (2002). Human CYP allele database: submission criteria procedures and objectives. *Methods Enzymol.* 357, 28–36.
- Ingelman-Sundberg, M., Daly, A.K., Oscarson, M., and Nebert, D.W. (2000). Human cytochrome P450 (CYP) genes: recommendations for the nomenclature of alleles. *Pharmacogenetics* 10, 91–93.
- Iribarne, C., Berthou, F., Baird, S., Dréano, Y., Picart, D., Bail, J.P., Beaune, P., and Ménez, J.F. (1996). Involvement of cytochrome P450 3A4 enzyme in the N-demethylation of methadone in human liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 365–373.
- Isbell, H., and Eisenman, A.J. (1948). The addiction liability of some drugs of the methadon series. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 93, 305–313.
- Ito, R., Robbins, T.W., and Everitt, B.J. (2004). Differential control over cocaine-seeking

behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat. Neurosci.* 7, 389–397.

Johansson, I., Lundqvist, E., Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjöqvist, F., and Ingelman-Sundberg, M. (1993). Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 11825–11829.

Johansson, I., Oscarson, M., Yue, Q.Y., Bertilsson, L., Sjöqvist, F., and Ingelman-Sundberg, M. (1994). Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol. Pharmacol.* 46, 452–459.

Johansson, I., Lundqvist, E., Dahl, M.L., and Ingelman-Sundberg, M. (1996). PCR-based genotyping for duplicated and deleted CYP2D6 genes. *Pharmacogenetics* 6, 351–355.

Kagimoto, M., Heim, M., Kagimoto, K., Zeugin, T., and Meyer, U.A. (1990). Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J. Biol. Chem.* 265, 17209–17214.

Kalivas, P.W., and Nakamura, M. (1999). Neural systems for behavioral activation and reward. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 223–227.

Kaplan (1993). *Biologie moléculaire et Médecine*, 2ème édition (Flammarion Medecine-Sciences).

Katzung (2003). *Basic & Clinical Pharmacology* ninth edition.

Kelley, A.E. (2004). Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* 44, 161–179.

Kessler, R.C., Nelson, C.B., McGonagle, K.A., Edlund, M.J., Frank, R.G., and Leaf, P.J. (1996). The epidemiology of co-occurring addictive and mental disorders: implications for prevention and service utilization. *Am. J. Orthopsychiatry* 66, 17–31.

Kim, J., Lee, S.-Y., and Lee, K.-A. (2012). Copy number variation and gene rearrangements in CYP2D6 genotyping using multiplex ligation-dependent probe amplification in Koreans. *Pharmacogenomics* 13, 963–973.

Kimura, S., Umeno, M., Skoda, R.C., Meyer, U.A., and Gonzalez, F.J. (1989). The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am. J. Hum. Genet.* 45, 889–904.

Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376–386.

Koob, G.F. (1999). Stress, corticotropin-releasing factor, and drug addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 897, 27–45.

Kramer, W.E., Walker, D.L., O’Kane, D.J., Mrazek, D.A., Fisher, P.K., Dukek, B.A., Bruflat,

J.K., and Black, J.L. (2009). CYP2D6: novel genomic structures and alleles. *Pharmacogenet. Genomics* 19, 813–822.

Kristensen, K., Christensen, C.B., and Christrup, L.L. (1995). The mu1, mu2, delta, kappa opioid receptor binding profiles of methadone stereoisomers and morphine. *Life Sci.* 56, PL45–50.

Leathart, J.B., London, S.J., Steward, A., Adams, J.D., Idle, J.R., and Daly, A.K. (1998). CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics* 8, 529–541.

Lennard, M.S., Silas, J.H., Freestone, S., Ramsay, L.E., Tucker, G.T., and Woods, H.F. (1982). Oxidation phenotype--a major determinant of metoprolol metabolism and response. *N. Engl. J. Med.* 307, 1558–1560.

Levrán, O., Peles, E., Hamon, S., Randesi, M., Adelson, M., and Kreek, M.J. (2013). CYP2B6 SNPs are associated with methadone dose required for effective treatment of opioid addiction. *Addict. Biol.* 18, 709–716.

Løvlie, R., Daly, A.K., Matre, G.E., Molven, A., and Steen, V.M. (2001). Polymorphisms in CYP2D6 duplication-negative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6*35 allele in ultrarapid metabolism? *Pharmacogenetics* 11, 45–55.

Lundqvist, E., Johansson, I., and Ingelman-Sundberg, M. (1999). Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes. *Gene* 226, 327–338.

Maheu, F., and Lupien, S. (2003). La mémoire aux prises avec les émotions et le stress : un impact nécessairement dommageable ? *Medecine Sciences* 19, 118–124.

Mahgoub, A., Idle, J.R., Dring, L.G., Lancaster, R., and Smith, R.L. (1977). Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 2, 584–586.

Maldonado, R. (2010). Le syst?me opio?de endog?ne et l’addiction aux drogues. *Ann. Pharm. Fr.* 68, 3–11.

Maréchal, J.-D., Kemp, C.A., Roberts, G.C.K., Paine, M.J.I., Wolf, C.R., and Sutcliffe, M.J. (2008). Insights into drug metabolism by cytochromes P450 from modelling studies of CYP2D6-drug interactions. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1, S82–89.

Mbwambo, J., McCurdy, S.A., Myers, B., Lambdin, B., Kilonzo, G.P., and Kaduri, P. (2012). Drug trafficking, use, and HIV risk: the need for comprehensive interventions. *SAHARA J J. Soc. Asp. HIVAIDS Res. Alliance SAHARA Hum. Sci. Res. Counc.* 9, 154–159.

McDonald, J., and Lambert, D.G. (2005). Opioid receptors. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain* 5, 22–25.

Michaud, and Turgeon (2002). Les cytochromes P450 et leur rôle clinique. *Médecin Quebec* 37, 76–80.

Le Moine, C. (2012). Quand le cerveau est accro.

- Monassier (2005). Les analgésiques centraux opiacés.
- Montague, P.R., Hyman, S.E., and Cohen, J.D. (2004). Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature* 431, 760–767.
- Moratalla, R., Elibol, B., Vallejo, M., and Graybiel, A.M. (1996). Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. *Neuron* 17, 147–156.
- Morel, A. (2006). Drogues et substitution, traitements et prise en charge du sujet (Belgique).
- Müller, B., Zöpf, K., Bachofer, J., and Steimer, W. (2003). Optimized strategy for rapid cytochrome P450 2D6 genotyping by real-time long PCR. *Clin. Chem.* 49, 1624–1631.
- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., and Levin, W. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA Mary Ann Liebert Inc* 6, 1–11.
- Nelson, D.R., and Nebert, D.W. (2011). Cytochrome P450 (*CYP*) Gene Superfamily. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd),.
- Nelson, D.R., Zeldin, D.C., Hoffman, S.M.G., Maltais, L.J., Wain, H.M., and Nebert, D.W. (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 14, 1–18.
- Nestler, E.J. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 119–128.
- Nestler, E.J. (2002). Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 78, 637–647.
- Nestler, E.J. (2004). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47 *Suppl* 1, 24–32.
- Nestler, E.J. (2012). Transcriptional mechanisms of drug addiction. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci. Off. Sci. J. Korean Coll. Neuropsychopharmacol.* 10, 136–143.
- Nielsen, M.D., Brosen, K., and Gram, L.F. (1990). A dose-effect study of the in vivo inhibitory effect of quinidine on sparteine oxidation in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 29, 299–304.
- Omura, T., and Sato, R. (1964). The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370–2378.
- Oscarson, M., Hidestrand, M., Johansson, I., and Ingelman-Sundberg, M. (1997). A combination of mutations in the CYP2D6*17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function. *Mol. Pharmacol.* 52, 1034–1040.

- Osikowska-Evers, B., Dayer, P., Meyer, U.A., Robertz, G.M., and Eichelbaum, M. (1987). Evidence for altered catalytic properties of the cytochrome P-450 involved in sparteine oxidation in poor metabolizers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 41, 320–325.
- Peles, E., Bodner, G., Kreek, M.J., Rados, V., and Adelson, M. (2007). Corrected-QT intervals as related to methadone dose and serum level in methadone maintenance treatment (MMT) patients: a cross-sectional study. *Addict. Abingdon Engl.* 102, 289–300.
- Pérez de los Cobos, J., Fidel, G., Escuder, G., Haro, G., Sánchez, N., Pascual, C., Valderrama, J.C., Valero, S., and Trujols, J. (2004). A satisfaction survey of opioid-dependent clients at methadone treatment centres in Spain. *Drug Alcohol Depend.* 73, 307–313.
- Pérez de los Cobos, J., Siñol, N., Trujols, J., del Río, E., Bañuls, E., Luquero, E., Menoyo, A., Queraltó, J.M., Baiget, M., and Alvarez, E. (2007). Association of CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype with deficient patient satisfaction regarding methadone maintenance treatment. *Drug Alcohol Depend.* 89, 190–194.
- Pérez de Los Cobos, J., Trujols, J., Valderrama, J.C., Valero, S., and Puig, T. (2005). Patient perspectives on methadone maintenance treatment in the Valencia Region: dose adjustment, participation in dosage regulation, and satisfaction with treatment. *Drug Alcohol Depend.* 79, 405–412.
- Raimundo, S., Fischer, J., Eichelbaum, M., Griese, E.U., Schwab, M., and Zanger, U.M. (2000). Elucidation of the genetic basis of the common “intermediate metabolizer” phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics* 10, 577–581.
- Ramamoorthy (2010). mechanisms of variability in CYP2D6 metabolism : the contribution of polymorphisms, copy number variations and microRNA.
- Reynaud (2010). Du réel au virtuel...Les prises de risques pour grandir autrement?
- Reynaud, M. (2006). *Traité d’addictologie*, (Flammarion Medecine-Sciences).
- Reynaud, Parquet, and Lagrue (2000). *Les pratiques addictives*. (Paris: Odile Jacob),.
- Rowland, P., Blaney, F.E., Smyth, M.G., Jones, J.J., Leydon, V.R., Oxbrow, A.K., Lewis, C.J., Tennant, M.G., Modi, S., Eggleston, D.S., et al. (2006). Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J. Biol. Chem.* 281, 7614–7622.
- Roy, A.K., McCarthy, C., Kiernan, G., McGorrian, C., Keenan, E., Mahon, N.G., and Sweeney, B. (2012). Increased incidence of QT interval prolongation in a population receiving lower doses of methadone maintenance therapy. *Addict. Abingdon Engl.* 107, 1132–1139.
- Sachse, C., Brockmöller, J., Bauer, S., and Roots, I. (1997). Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 284–295.
- Saladores, P.H., Precht, J.C., Schroth, W., Brauch, H., and Schwab, M. (2013). Impact of metabolizing enzymes on drug response of endocrine therapy in breast cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 13, 349–365.

- Schaeffeler, E., Schwab, M., Eichelbaum, M., and Zanger, U.M. (2003). CYP2D6 genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR. *Hum. Mutat.* 22, 476–485.
- Schmid, B., Bircher, J., Preisig, R., and Küpfer, A. (1985). Polymorphic dextromethorphan metabolism: co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquin hydroxylation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 38, 618–624.
- Schultz, W., Dayan, P., and Montague, P.R. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275, 1593–1599.
- Schwabe, L., Dickinson, A., and Wolf, O.T. (2011). Stress, habits, and drug addiction: a psychoneuroendocrinological perspective. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 19, 53–63.
- Scott, C.C., Robbins, E.B., and Chen, K.K. (1948). Pharmacologic comparison of the optical isomers of methadon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 93, 282–286.
- Shastri, B.S. (2006). Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J.* 6, 16–21.
- Shimizu, H., Inoue, K., and Mori, M. (2007). The leptin-dependent and -independent melanocortin signaling system: regulation of feeding and energy expenditure. *J. Endocrinol.* 193, 1–9.
- Shiran, M.R., Chowdry, J., Rostami-Hodjegan, A., Ellis, S.W., Lennard, M.S., Iqbal, M.Z., Lagundoye, O., Seivewright, N., and Tucker, G.T. (2003). A discordance between cytochrome P450 2D6 genotype and phenotype in patients undergoing methadone maintenance treatment. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56, 220–224.
- Stringer, J., Welsh, C., and Tommasello, A. (2009). Methadone-associated Q-T interval prolongation and torsades de pointes. *Am. J. Heal.-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Heal.-Syst. Pharm.* 66, 825–833.
- Tyndale, R., Aoyama, T., Broly, F., Matsunaga, T., Inaba, T., Kalow, W., Gelboin, H.V., Meyer, U.A., and Gonzalez, F.J. (1991). Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281: possible association with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 1, 26–32.
- Volkow, N.D., and Fowler, J.S. (2000). Addiction, a Disease of Compulsion and Drive: Involvement of the Orbitofrontal Cortex. *Cereb. Cortex* 10, 318–325.
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., and Wang, G.-J. (2003). The addicted human brain: insights from imaging studies. *J. Clin. Invest.* 111, 1444–1451.
- Waelti, P., Dickinson, A., and Schultz, W. (2001). Dopamine responses comply with basic assumptions of formal learning theory. *Nature* 412, 43–48.
- Waldhoer, M., Bartlett, S.E., and Whistler, J.L. (2004). Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 953–990.

- Wang, J.-S., and DeVane, C.L. (2003). Involvement of Cyp3a4, Cyp2c8, and Cyp2d6 in the Metabolism of (r)- and (s)-Methadone in Vitro. *Drug Metab. Dispos.* *31*, 742–747.
- Wang, A., Savas, U., Hsu, M.-H., Stout, C.D., and Johnson, E.F. (2012). Crystal Structure of Human Cytochrome P450 2D6 with Prinomastat Bound. *J. Biol. Chem.* *287*, 10834–10843.
- Wu, D., Otton, S.V., Sproule, B.A., Busto, U., Inaba, T., Kalow, W., and Sellers, E.M. (1993). Inhibition of human cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) by methadone. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *35*, 30–34.
- Zanger, U.M., Vilbois, F., Hardwick, J.P., and Meyer, U.A. (1988). Absence of hepatic cytochrome P450bufI causes genetically deficient debrisoquine oxidation in man. *Biochemistry (Mosc.)* *27*, 5447–5454.
- Zanger, U.M., Fischer, J., Raimundo, S., Stüven, T., Evert, B.O., Schwab, M., and Eichelbaum, M. (2001). Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics* *11*, 573–585.
- Zanger, U.M., Raimundo, S., and Eichelbaum, M. (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *369*, 23–37.
- Zanger, U.M., Turpeinen, M., Klein, K., and Schwab, M. (2008). Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal. Bioanal. Chem.* *392*, 1093–1108.
- Zhang, X., Odom, D.T., Koo, S.-H., Conkright, M.D., Canettieri, G., Best, J., Chen, H., Jenner, R., Herbolsheimer, E., Jacobsen, E., et al. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 4459–4464.
- Zhou, S.-F. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin. Pharmacokinet.* *48*, 689–723.

Nom – Prénoms : Troudet Réjane Liliane Nolvène

Titre du mémoire-thèse : Mise au point et intérêt de l'étude des polymorphismes du gène *CYP2D6* chez les patients traités par méthadone

Résumé du mémoire-thèse :

Le cytochrome 2D6 métabolise 20 à 30% des médicaments. La méthadone, utilisée dans le traitement de substitution des pharmacodépendances aux opiacés, fait partie de ces médicaments. Le CYP2D6 présente des polymorphismes génétiques qui peuvent entraîner un métabolisme ultra-rapide de la méthadone, nécessitant une adaptation posologique. Ce métabolisme accru peut s'expliquer par la présence de duplications du gène *CYP2D6* et par l'allèle *CYP2D6*35*. La mise au point de deux techniques moléculaires, que sont la MLPA et la HRM, a été réalisée pour mettre en évidence ces variations. Les résultats obtenus sur 116 ADN testés a permis de démontrer la faisabilité du génotypage du CYP2D6 en routine et de confirmer l'implication des duplications et un possible rôle de l'allèle *35 dans le métabolisme ultra-rapide. Ces résultats ont permis de souligner l'importance d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires afin de faciliter la recherche et l'identification des métaboliseurs ultra-rapides.

MOTS CLES : CYP2D6 – pharmacogénétique – méthadone – polymorphismes – médecine personnalisée

JURY

PRESIDENT : M. Alain PINEAU, PU-PH de Toxicologie

Faculté de pharmacie de Nantes

ASSESEURS : M. Stéphane BEZIEAU, PU-PH de Génétique – Nantes

Faculté de médecine de Nantes

M. Régis BOUQUIE, PA-attaché de faculté de Pharmacologie –

Faculté de médecine de Nantes

Mme Marie BRONNEC, PH en Addictologie-Nantes

Adresse de l'auteur : – 56730 St Gildas de Rhuys