Profils génétiques de lignées cellulaires humaines modèles en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardio-vasculaires

Elise Jeannesson

▶ **To cite this version:**

Elise Jeannesson. Profils génétiques de lignées cellulaires humaines modèles en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardio-vasculaires. Sciences pharmaceutiques. 2007. hal-01738848

HAL Id: hal-01738848
https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01738848

Submitted on 20 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

T/PH/N/2007/2073

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

2007

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de PHARMACIE SPECIALISEE

Soutenu devant le Jury Interrégional le **03 octobre 2007**

par **Elise JEANNESSON** née le 25 octobre 1979

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988, tient lieu de :

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

PROFILS GENETIQUES DE LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES MODELES EN PHYSIOPATHOLOGIE ET PHARMACOTOXICOLOGIE CARDIO-VASCULAIRES

Membres du Jury

Président : Professeur Gérard SIEST, Faculté de Pharmacie, Nancy

Juges : Professeur Yves ARTUR, Faculté de Pharmacie, Dijon
Docteur Danièle BENSOUSSAN, Praticien Hospitalier, Nancy
Docteur Nicolas GAMBIER, MCU-PH, Nancy
Docteur Roselyne GARNOTEL, MCU-PH, Reims

BU PHARMA-ODONTOL
D 104 073566 7

PPN 120839210
BIB 190543

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

2007

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de PHARMACIE SPECIALISEE

Soutenu devant le Jury Interrégional le **03 octobre 2007**

par **Elise JEANNESSON** née le 25 octobre 1979

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988, tient lieu de :

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

PROFILS GENETIQUES DE LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES MODELES EN PHYSIOPATHOLOGIE ET PHARMACOTOXICOLOGIE CARDIO-VASCULAIRES

Membres du Jury

Président : Professeur Gérard SIEST, Faculté de Pharmacie, Nancy

Juges : Professeur Yves ARTUR, Faculté de Pharmacie, Dijon
Docteur Danièle BENSOUSSAN, Praticien Hospitalier, Nancy
Docteur Nicolas GAMBIER, MCU-PH, Nancy
Docteur Roselyne GARNOTEL, MCU-PH, Reims

Membres du personnel enseignant 2006/2007

Doyen
Chantal FINANCE
Vice Doyen
Francine PAULUS
Président du Conseil de la Pédagogie
Pierre LABRUDE
Responsable de la Commission de la Recherche
Jean-Claude BLOCK
Directeur des Etudes
Gérald CATAU
Responsable de la Filière officine
Gérald CATAU
Responsables de la Filière industrie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Isabelle LARTAUD
Responsable de la Filière hôpital
Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mle BESSON Suzanne
Mle GIRARD Thérèse
M. JACQUE Michel
M. LECTARD Pierre
M. LOPPINET Vincent
M. MIRJOLET Marcel
M. MORTIER François
M. PIERFITTE Maurice
M. SCHWARTZBROD Louis

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger
M. HOFFMAN Maurice
M. SIEST Gérard

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Mme FUZELLIER Marie-Claude
Mle IMBS Marie-Andrée
M. MONAL Jean-Louis
Mme POCHON Marie-France
Mme ROVEL Anne
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Marie Monica

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie cardiovasculaire
M	AULAGNER Gilles	Pharmacie clinique
M.	BAGREL Alain	Biochimie
M.	BLOCK Jean-Claude	Santé publique
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacologie cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Virologie, immunologie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Mathématiques, physique, audioprothèse
Mle	GALTEAU Marie-Madeleine	Biochimie clinique
M.	HENRY Max	Botanique, mycologie
M.	JOUZEAU Jean-Yves	Bioanalyse du médicament
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie, orthopédie, maintien à domicile
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
Mme	LARTAUD Isabelle	Pharmacologie
Mme	LAURAIN-MATTAR Dominique	Pharmacognosie
M.	LEROY Pierre	Chimie physique générale
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MERLIN Jean-Louis	Biologie cellulaire oncologique
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique
M.	REGNOUF de VAINS Jean-Bernard	Chimie thérapeutique
M.	RIHN Bertrand	Biochimie
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie, parasitologie
M.	SIMON Jean-Michel	Economie de la santé, législation pharmaceutique
M.	VIGNERON Claude	Hématologie, physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Communication et santé
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	BOURRA Cédric	Physiologie
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, organisation animale
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique, mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Mme	Florence DUMARCAY	Chimie thérapeutique
M.	François DUPUIS	Pharmacologie
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LAMBERT Alexandrine	Informatique, biostatistiques
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mle	MARCHAND Stéphanie	Chimie physique
M.	MEHRI-SOUSSI Faten	Hématologie biologique
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MERLIN Christophe	Microbiologie environnementale et moléculaire
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAPIN Anne	Pharmacie galénique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
M.	ZAIOU Mohamed	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

		Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

Ð' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

Ð'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

Ðe ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Siest pour m'avoir dirigé dans ce travail et le Docteur Sophie Visvikis-Siest pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe Inserm «Génétique Cardiovasculaire» du CIC 9501.

Je souhaite remercier également les personnes qui m'ont gracieusement donné un échantillon des lignées cellulaires nécessaires à cette étude : le Professeur Michel Dauca (HepG2), le Docteur Nicole Sabolovic (Caco2), le Professeur Pierre Jeannesson (K562) et le Docteur Roselyne Garnotel (U937, Thp1).

Merci à Hind, Suzanne et Christine pour leur aide précieuse.

Enfin, je remercie les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse d'exercice.

TABLE DES MATIERES

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

LISTE DES TABLEAUX 3
LISTE DES FIGURES 4
LISTE DES ANNEXES 4
LISTE DES ABREVIATIONS 5

I. INTRODUCTION 6
A. Maladies cardio-vasculaires : Impact en santé publique 6
B. Risque cardio-vasculaire 7
1. Définitions 7
2. Différents facteurs de risque 7
C. Gènes impliqués dans les maladies cardio-vasculaires 9
D. Sélection des polymorphismes 12
1. Polymorphismes génétiques : généralités 12
2. Polymorphismes sélectionnés 13
E. Modèles cellulaires 15
1. Différents modèles 15
a. Culture d'organe 15
b. Culture primaire 15
c. Lignées cellulaires 16
2. Lignées cellulaires continues 16
a. Présentation 16
b. Applications 17
3. Environnement des cellules en culture 19
a. Adhérence 19
b. Milieu de culture 19
4. Présentation des lignées cellulaires étudiées 21
a. Modèles de cellules non adhérentes 21
b. Modèles hépatiques 22
c. Modèle intestinal 23

II. OBJECTIF 24

III. MATERIELS ET METHODES 25
A. Culture cellulaire 25
1. Préparation des milieux de culture 25
2. Décongélation d'une lignée cellulaire 25
3. Numération cellulaire 25
4. Repiquage 26
a. Cellules en suspension 26
b. Cellules adhérentes 26
B. Extraction de l'ADN génomique 27
1. Principe 27
2. Matériels 27
3. Réactifs 27
4. Protocole 28

a. Isolement des cellules 28
b. Dégradation des protéines et des membranes 28
c. Extraction de l'ADN par déshydratation et précipitation des protéines dégradées 28
d. Précipitation de la pelote d'ADN 29
e. Solubilisation de l'ADN 29
f. Détermination de la concentration en ADN 29
g. Stockage de l'ADN 29
C. PCR Multiplex-révélation colorimétrique 30
1. PCR 30
a. Principe 30
b. Matériel 31
c. Mélange réactionnel 31
d. Protocole 31
2. Détection 32
a. Principe 32
b. Matériel 32
c. Réactifs 32
d. Tampons 33
e. Protocole 33
3. Lecture des résultats 34
D. PCR-RFLP 36
1. PCR 36
a. Principe 36
b. Protocole 36
2. Digestion enzymatique (RFLP) 38
a. Principe 38
b. Protocole 38
3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 39
a. Principe 39
b. Protocole 39
E. Génotypage par technique TaqMan 40
1. Principe 40
2. Matériel 41
3. Réactifs 41
4. Protocole 42
a. Préparation des échantillons et du mixe de PCR 43
b. Programme de PCR 43
c. Lecture des résultats 44

IV. RESULTATS 45
A. Rendements de l'extraction d'ADN 45
B. Résultats des génotypages 45
C. Synthèse des résultats 48

V. DISCUSSION 59

BIBLIOGRAPHIE 64

ANNEXES. 71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Facteurs de risque cardio-vasculaires identifiés

Tableau II : Présentation des gènes candidats du risque cardio-vasculaire étudiés

Tableau III : Composition type d'un milieu de culture

Tableau IV : Composition du mixe réactionnel pour un échantillon

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

Tableau VI : Programmes de PCR

Tableau VII : Séquences des amorces

Tableau VIII : Enzymes de restriction, sites de reconnaissance et longueur des fragments

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

Tableau X : Rendements de l'extraction d'ADN

Tableau XI : Résultats du génotypage par PCR-RFLP

Tableau XII : Résultats du génotypage par TaqMan SNP genotyping assays

Tableau XIII : Génotypes des lignées pour une sélection de polymorphismes de gènes de l'inflammation, de l'adhésion cellulaire, de facteur de croissance cellulaire et du système immun

Tableau XIV : Génotypes des lignées pour une sélection de polymorphismes de gènes du métabolisme des lipides et des lipoprotéines

Tableau XV : Génotypes des lignées pour une sélection de polymorphismes de gènes impliqués dans la régulation de la pression artérielle

Tableau XVII : Génotypes des lignées pour une sélection de polymorphismes de gènes impliqués dans le stress oxydant et codant des facteurs de transcription

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Morphologie à faible densité et à forte densité de lignées monocytaire (Thp1), myélocytaire (HL60), hépatocytaire (HepG2) et entérocytaire (Caco2)

Figure 2 : Principe d'un cycle de PCR

Figure 3 : Principe de la détection colorimétrique associée à la PCR Multiplex

Figure 4 : Lecture des bandelettes

Figure 5 : Profils de restriction obtenus pour les 5 polymorphismes étudiés par PCR-RFLP

Figure 6 : Résultats des appariements et des misappariements entre les séquences cibles et sondes dans les essais dans les essais utilisant la technologie TaqMan

Figure 7 : Utilisation de la fluorescence dans la technologie TaqMan

Figure 8 : Résumé de la procédure de génotypage utilisant la technologie TaqMan

Figure 9 : Détermination des génotypes en fonction du type de fluorescence

Figure 10 : Résultats du génotypage par les Multiplex IIA, IIB et III

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Présentation des gènes impliqués en physiopathologie cardio-vasculaire étudiés

Annexe 2 : Préparation des milieux de culture propres à chaque lignée cellulaire

Annexe 3 : Protocole de décongélation d'une lignée cellulaire

Annexe 4 : Protocole de numération cellulaire

Annexe 5 : Préparation des réactifs nécessaires à l'extraction d'ADN

Annexe 6 : Codification des résultats de génotypage par PCR Multiplex

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC : ATP binding-cassette

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALD : Affections de longue durée

Apo : Apolipoprotéine

ATCC : *American type culture collection*

CYP450 : Cytochromes P450

DL : Déséquilibre de liaison

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO : Dimethylsulfoxide

dNTP : desoxyribonucleotides triphosphates

ECACC : *European collection of cell cultures*

HDL : *High density lipoprotein*

LDL : *Low density lipoprotein*

MEM : *Minimum Essential Medium*

NCBI : *National center for biotechnology information*

OMIM : *Online mendelian inheritance in man*

pb : Paires de bases

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

RFLP : *Restriction Fragment Lengh Polymorphism*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SNP : *Single nucleotide polymorphism*

SA-HRP : *Streptavidine-horseradish peroxydase*

SSPE : Solution sodium phosphate EDTA

SVF : Sérum de veau fœtal

TBE : Tris Borate EDTA

TEMED : NNN'N'-Tétra Méthyl Ethylène Diamine

TG : Triglycérides

TMB : Tétraméthylbenzidine

XME : *Xenobiotic metabolizing enzyme*

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

I. INTRODUCTION

A. Maladies cardio-vasculaires : Impact en santé publique

Sous la terminologie de « maladies cardio-vasculaires », la littérature fait référence à différents événements ayant généralement en commun une physiopathologie liée à l'athérosclérose infraclinique et responsable de mort prématurée [1]. Il peut s'agir de :

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

Les affections cardio-vasculaires occupent une place prépondérante dans la morbidité et la mortalité dans les pays développés, en particulier en France. Elles sont parmi les deux premières causes de mortalité dans le monde avec le cancer. En 2003, 32 % des décès enregistrés en France étaient liés à une pathologie cardio-vasculaire : 27 % par cardiopathie ischémique, 25 % par accident vasculaire cérébral, 23 % par insuffisance cardiaque et 25 % par les autres pathologies vasculaires [1]. Même si la mortalité due à ces affections diminue depuis une vingtaine d'années grâce aux progrès de la médecine, elles restent de première importance en santé publique. Ainsi, la morbidité déclarée liée aux maladies cardio-vasculaires a été multipliée par trois en 20 ans. En 2001, les prises en charge en affection de longue durée (ALD) des maladies cardio-vasculaires (accident vasculaire invalidant, artériopathie chronique évolutive avec manifestations cliniques ischémiques, infarctus du myocarde datant de moins de 6 mois, hypertension artérielle sévère, insuffisance cardiaque grave) concernaient 31 % des hommes et 17 % des femmes âgés de 25 à 64 ans. Au-delà de 65 ans, 35 % des causes de décès, 16 % des hospitalisations, 41 % des admissions en ALD et 71 % des causes de morbidité déclarée étaient liées à une maladie cardio-vasculaire. Enfin, le montant des remboursements des médicaments à visée cardio-vasculaire était de 3,9 milliards d'euros en 2002 (montant présenté au remboursement pour le régime général de l'assurance maladie, hors sections locales mutualistes), ce qui correspondait à 25 % des dépenses de santé et 17 % de la totalité des médicaments prescrits [1].

B. Risque cardio-vasculaire

1. Définitions

- Risque cardio-vasculaire :

Le risque cardio-vasculaire est un risque composite qui fait référence à la probabilité de survenue d'un événement cardio-vasculaire.

- Facteur de risque cardio-vasculaire :

Un facteur de risque cardio-vasculaire peut être défini comme un état clinique ou biologique qui augmente le risque de survenue d'un événement cardio-vasculaire donné. Pour qu'un critère soit retenu comme facteur de risque, il faut que son association avec la pathologie soit statistiquement forte, graduelle et cohérente dans le temps, observée de manière similaire dans l'ensemble des études épidémiologiques et dans des populations différentes. Cette association persiste lorsque les autres facteurs de risque sont pris en compte.

2. Différents facteurs de risque

Deux types de facteurs de risque interviennent dans les maladies cardio-vasculaires. Il y a d'une part des facteurs non modifiables comme l'âge, le sexe ou l'hérédité. Et d'autre part, il existe des facteurs modifiables, c'est-à-dire qu'il est possible d'agir sur leur niveau, ce qui les rend accessibles à des tentatives de prévention. Ce sont par exemple l'hypertension artérielle, la dyslipidémie, le diabète et l'obésité. Les facteurs environnementaux tels que le tabac et la sédentarité, le stress et l'alcool en font également partie.

Tableau I : Facteurs de risque cardio-vasculaires identifiés (d'après [1]).

Lien de causalité	Facteur de risque identifié	Impact du facteur de risque
Facteurs de risque **majeurs**	- Tabagisme - Hypertension artérielle - Élévation du cholestérol total - Élévation du LDL-cholestérol - Diminution du HDL-cholestérol - Diabète de type 2 - Âge	- Effet multiplicateur du risque cardio-vasculaire indépendamment des autres facteurs de risque
Facteurs de risque **prédisposants**	- Obésité androïde - Sédentarité - Antécédents familiaux de maladie coronarienne précoce (H < 55 ans, F < 65 ans) - Origine géographique - Précarité - Ménopause	- Effet potentialisateur lorsqu'ils sont associés aux facteurs de risque majeurs
Facteurs de risque **discutés**	- Élévation des triglycérides - Lipoprotéines LDL petites et denses - Élévation de l'homocystéine - Élévation de la lipoprotéine A - Facteurs prothrombotiques (fibrinogène, inhibiteur de l'activateur du plasminogène) - Marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) - Facteurs génétiques - Facteurs infectieux (*Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, cytomégalovirus)	- Associé à un risque augmenté de maladie cardio-vasculaire (coronarienne et/ou vasculaire cérébrale) mais le degré d'imputabilité est méconnu

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

Les recommandations européennes et américaines identifient 3 groupes de facteurs de risque cardio-vasculaire classés selon leur degré d'imputabilité (Tableau I) :

- les facteurs de risque majeurs,
- les facteurs de risque prédisposants,
- et les facteurs de risque discutés.

Ainsi, l'âge, l'hypertension artérielle, les dyslipidémies et le diabète ont été identifiés, avec le tabagisme, comme les principaux facteurs de risque cardio-vasculaire.

L'obésité, la sédentarité, les facteurs psychosociaux comme la précarité mais aussi l'origine géographique et le statut hormonal chez la femme sont considérés comme des facteurs de risque prédisposants et doivent être pris en compte dans une démarche de prévention primaire de l'hypertension artérielle, du diabète et des dyslipidémies.

Cependant, ces facteurs ne suffisent pas toujours à expliquer ces pathologies. D'autres facteurs de risque sont discutés comme les facteurs thrombogéniques, l'homocystéine, les marqueurs de l'inflammation, les marqueurs de l'infection, et les facteurs génétiques. La prise en compte des facteurs génétiques et/ou d'interactions gènes-environnement peut ainsi permettre de découvrir de nouveaux facteurs de risque. Certaines pathologies cardio-vasculaires, comme les hypercholestérolémies familiales, sont d'origine monogénique et ont été facilement identifiées par l'étude des quelques familles porteuses. Mais la plupart de ces pathologies sont complexes et de multiples facteurs génétiques et environnementaux contribuent au développement et à la progression de ces pathologies dans la population générale. L'un des challenges consiste à identifier les polymorphismes génétiques fréquents qui indépendamment peuvent ne conférer qu'un risque modeste mais qui, collectivement, peuvent donner un profil à haut risque.

C. Gènes impliqués dans les maladies cardio-vasculaires

Il est clairement établi que des concentrations plasmatiques élevées en cholestérol total, en LDL cholestérol (LDLc), en Apolipoprotéine B (ApoB), en triglycérides (TG) ou des concentrations faibles en HDL cholestérol (HDLc) et en Apolipoprotéine A1 (ApoA1) sont des facteurs pro-athérogènes prédictifs du risque cardio-vasculaire. La connaissance du profil lipidique peut prédire les personnes à risque avant l'apparition de la pathologie [2]. De nombreuses autres voies biologiques sont susceptibles de contribuer au développement et à la progression des maladies cardio-vasculaires et notamment au processus athéro-sclérotique. D'autre part, ces systèmes peuvent interagir entre eux. Par exemple, le gène codant la sélectine E (*SELE*), une molécule impliquée dans l'adhésion cellulaire, a également été associé aux concentrations plasmatiques de lipides [2].

Nous avons retenu 68 gènes candidats (Tableau II) sélectionnés dans les processus biologiques impliqués dans le développement et la progression des maladies cardio-vasculaires, dont :

- inflammation,
- adhésion cellulaire,
- système immun,
- croissance cellulaire,
- métabolisme des lipides et des lipoprotéines,
- régulation de la pression artérielle,
- coagulation et le métabolisme de l'homocystéine,
- stress oxydant,
- transcription.

Tableau II : Présentation des gènes étudiés.

Processus Biologique	Gène d'intérêt	
	Symbole	**Nom**
INFLAMMATION	*CCR2*	Récepteur chimiokine 2
	CCR3	Récepteur chimiokine 3
	CCR5	Récepteur chimiokine 5
	CSF2	Facteur stimulant des colonies 2
	IL10	Interleukine 10
	IL13	Interleukine 13
	IL1A	Interleukine 1alpha
	IL1B	Interleukine 1béta
	IL4	Interleukine 4
	IL4R	Récepteur à l'IL4
	IL5RA	Récepteur à l'IL5 type alpha
	IL6	Interleukine 6
	IL9	Interleukine 9
	LTA (ou *TNFB)*	Lymphotoxine alpha
	SCYA11 (ou *CCL11)*	Chimiokine ligand 11
	SDF1 (ou *CXCL12)*	Chimiokine ligand 12
	TNFA	Facteur alpha de nécrose des tumeurs
	UGB (ou *SCGB1A1)*	Utéroglobine
ADHESION CELLULAIRE	*ICAM1*	Molécule d'adhésion inter-cellulaire 1
	MMP3	Métalloprotéinase matricielle 3
	SELE (ou *ELAM)*	E sélectine
	SELP	P sélectine
	VCAM1	Molécule d'adhésion vasculaire 1
FACTEURS DE CROISSANCE	*TGFB1*	Facteur de croissance transformant béta 1
SYSTÈME IMMUN	*C3*	Composant C3 du complément
	C5	Composant C5 du complément
	CD14	Antigène CD14
	CTLA4	Antigène 4 associé au LT cytotoxique
	FCER1B (ou *MS4A2)*	Polypeptide béta du récepteur de haute affinité pour le fragment Fc des IgE
METABOLISME DES LIPIDES ET DES LIPOPROTEINES	*ABCA1*	Transporteur ABCA1
	ABCB1 (ou *MDR1)*	Transporteur ABCB1
	ABCG8	Transporteur ABCG8
	APOAIV	Apolipoprotéine A-IV
	APOB	Apolipoprotéine B
	APOCIII	Apolipoprotéine C-III
	APOE	Apolipoprotéine E
	CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol

Processus Biologique	Gène d'intérêt	
	Symbole	Nom
(suite)	*LDLR*	Récepteur aux LDL
	LIPC	Lipase Hépatique
	LPA	Lipoprotéine a
	LPL	Lipoprotéine lipase
PRESSION ARTERIELLE	**Système Rénine-Angiotensine**	
	ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
	AGT	Angiotensinogène
	AGT1R (ou *AT1R)*	Récepteur à l'angiotensine II de type 1
	Récepteurs adrenergiques-cholinergiques	
	ADRB2	Récepteur adrénergique béta 2
	ADRB3	Récepteur adrénergique béta 3
	GNB3	Sous-unité 3 de la Protéine G
	Système sodique	
	ADD1 (ou *alpha ADD)*	Alpha-adducine
	SCNN1A (ou *EnaC alpha)*	Canal sodium épithelial, sous-unité alpha
	Metabolisme de l'acide arachidonique	
	LTC4S	Leukotriène C4 synthase
	Vasodilatation	
	NPPA (ou *ANP)*	Précurseur du peptide natriurétique auriculaire
	NOS2A	Synthase inductible de l'oxyde nitrique
	NOS3	Synthase endothéliale de l'oxyde nitrique
COAGULATION	*FII*	Facteur II (prothrombine)
	FV	Facteur V
	FVII	Facteur VII
	FGB	Fibrinogène, chaine béta
	GP1A (ou *ITGA2)*	Glycoprotéine la
	GP3A (ou *ITGB3)*	Glycoprotéine IIIa
	PAI1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
METABOLISME DE L'HOMOCYSTEINE	*CBS*	Cystathionine béta-synthase
	MTHFR	Méthylène tétrahydrofolate réductase
STRESS OXYDANT	*PON1*	Paraoxonase 1
	PON2	Paraoxonase 2
FACTEURS DE TRANSCRIPTION	*PPARG*	Récepteur gamma des proliférateurs des peroxisomes activés
	TCF7	Facteur de transcription 7
	VDR	Recepteur à la vitamine D
AUTRES	*GC* (ou *VDBP)*	Protéine de liaison à la vitamine D

En Annexe 1 sont présentés le(s) rôle(s) physiologique(s) des protéines et les dysfonctionnements associés à l'expression de ces gènes. Cette annexe présente également la localisation chromosomique des gènes et leur(s) lieu(x) d'expression. Le numéro OMIM correspond à la description de la protéine faite par la base de données Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) accessible depuis le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

D. Sélection des polymorphismes

1. Polymorphismes génétiques : généralités

Différents types de variations de l'acide désoxyribonucléique (ADN) sont observés chez l'homme [3] :

- des translocations, inversions, délétions et insertions de fragments,
- des séquences répétées en chaîne/en tandem,
- des mutations ponctuelles formées de délétion, insertion ou substitution d'un nucléotide. Ces mutations ponctuelles prennent le nom de polymorphismes ou SNPs (pour *Single Nucleotide Polymorphisms*) lorsque leur fréquence est supérieure à 1% dans la population générale.

La majorité de ces variations est constituée par les mutations ponctuelles. Des millions de SNPs ont ainsi été rapportés dans le génome humain ces dernières années [4].

Il existe de nombreuses techniques [3] pour mettre en évidence un polymorphisme telles que :

- Réaction de polymérisation en chaîne - Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP),
- PCR et hybridation spécifique d'allèle avec une ou deux sonde(s) discriminante(s) (marquage de l'ADN ou de la sonde par fluorescence ou radioactivité),
- Mesure du point de fusion par PCR en temps réel (rt-PCR) (les produits d'amplification peuvent alors être détectés selon deux grands principes : par marquage non spécifique avec des agents se liant à l'ADN double brin (Sybr Green I) ou plus généralement par marquage spécifique à l'aide de sondes fluorescentes (sondes TaqMan ou balises moléculaires)),
- PCR-séquençage,

- Chromatographie liquide dénaturante haute performance (dHPLC),
- etc...

2. Polymorphismes sélectionnés

De nombreux facteurs de risque environnementaux et génétiques contribuent au développement de pathologies fréquentes, y compris les maladies cardio-vasculaires et le cancer. Cet aspect multifactoriel rend difficile l'étude inter-individuelle de la susceptibilité à ces pathologies. L'étiologie des maladies cardio-vasculaires est influencée par de nombreux gènes qui ont chacun des effets modestes. L'analyse combinée de multiples variants génétiques est ainsi plus pertinente que l'analyse individuelle de gènes candidats. D'autant que 2 variants peuvent avoir des effets synergiques ou antagonistes. Par exemple, Pallaud et collaborateurs montrent que l'effet bénéfique de l'allèle ε2 de l'*APOE* sur les taux d'ApoB dépasse l'effet néfaste de l'*APOC3* 1100T chez l'homme ou de l'*APOB* 71Thr chez la femme [2].

Il est donc nécessaire de développer des technologies haut débit permettant d'acquérir un maximum d'informations pour un maximum d'individus en un minimum de temps, facilitant ainsi l'étude de nombreux polymorphismes dans de larges cohortes. C'est dans cette perspective que notre équipe a mis au point, en collaboration avec les laboratoires Roche Molecular System Inc., une technique dite multiplex de génotypage qui permet de détecter de nombreux polymorphismes [5]. Il existe plusieurs générations de ce système qui permettent d'étudier une centaine de sites polymorphes pour une soixantaine de gènes candidats des pathologies cardio-vasculaires. Ce système de PCR-détection Multiplex a permis dans des études précédentes de mettre en évidence plusieurs gènes candidats de certaines pathologies cardio-vasculaires. Hoppe et collaborateurs ont appliqué cette méthode pour étudier les interactions génétiques et le risque d'atteinte cardiaque chez les enfants atteints de drépanocytose [6-7]. Cette technique a également été utilisée dans une cohorte de sujets sains, la cohorte Stanislas, pour étudier la contribution de certains variants génétiques à la variabilité des lipides plasmatiques [2], à l'épaisseur intima-média [8], à la concentration en insuline [9] ou au taux plasmatique de la chimiokine MCP1 [10]. Ainsi, Hoppe *et al.* ont montré une augmentation de la susceptibilité de réaliser un accident vasculaire cérébral chez les enfants présentant une anémie falciforme porteurs des polymorphismes *IL4R* 503, *TNFα*-308, *ADRB2* 27, *VCAM1* -1594 et *Nco*I du *LDLR* [7] tandis que le polymorphisme *CBS* 278thr aurait un rôle protecteur [6]. Pallaud et collaborateurs ont montré que les polymorphismes Thr71Ile de

l'*APOB*, 112/158 de l'*APOE*, 1100C/T de l'*APOCIII* et surtout le polymorphisme G98T du gène codant la E sélectine ont un effet significatif sur les traits lipidiques dans la cohorte Stanislas, suggérant des voies métaboliques multiples contribuant à la complexité de la variabilité des lipides [2]. De plus, Pallaud et coll. ont montré que, chez les hommes de la cohorte, 6 polymorphismes (T3206G, C3175G et C1100T de l'*APOCIII*, Ile405Val de la *CETP*, C677T du *MTHFR* et G-405A du fibrinogène) expliquent 20% de la variabilité de l'épaisseur intima-media de la carotide [8]. Enfin, Berrahmoune H *et al.*, ont montré la présence d'un polymorphisme dans le bloc du *TNFA* capable de moduler la concentration circulante du MCP1, un marqueur potentiel d'athérosclérose [10].

Nous avons également utilisé 2 autres techniques, PCR-RFLP et sondes TaqMan, pour génotyper 8 polymorphismes de transporteurs à ATP binding-cassette (ABC) intervenant dans l'homéostasie des lipides et des apolipoprotéines.

Au total, nous avons retenu 120 variants (dont 8 composent 4 haplotypes de 2 polymorphismes). Ces variants ont été retenus d'après la littérature en fonction d'une part de leur effet sur l'expression ou l'activité de la protéine qu'ils codent ou de leur effet sur la susceptibilité à une pathologie cardio-vasculaire et d'autre part, pour leur fréquence élevée dans la population [2, 5-7, 9, 11].

Le déséquilibre de liaison (DL) est un concept qui permet de prédire l'évolution simultanée de 2 loci situés sur le même chromosome. Plus le déséquilibre de liaison est important, plus la probabilité que les deux allèles soient transmis ensemble est élevée. Dû à l'existence de déséquilibres de liaison importants, certains polymorphismes de cette étude doivent être considérés en bloc, c'est à dire sous la forme d'haplotypes. C'est le cas notamment pour *TNFA* G-244A/G-238A, *APOE* CYS112arg/ARG158cys, *CETP* C-631a/C-629a et *GC* ASP416glu/THR420lys. Les polymorphismes de l'*APOC3*, *SELE* et LPL devraient être considérés de la même façon.

Pour faciliter la lecture du mémoire, nous ne présentons pas ici les polymorphismes sélectionnés. Ces polymorphismes sont détaillés dans les tableaux XIII à XVII de la section résultats (IV.C) qui mettent en parallèle les polymorphismes, leurs effets d'après la littérature, et les résultats du génotypage des lignées.

E. Modèles cellulaires

1. Différents modèles

Il existe trois types de cultures cellulaires qui s'éloignent progressivement des caractéristiques des cellules normales *in vivo* pour se rapprocher de conditions simplifiées d'expérimentation : la culture d'organe, les cellules en culture primaire et les lignées cellulaires [12]. Le choix du modèle le plus approprié est fonction de la question biologique posée, des contraintes expérimentales et plus prosaïquement, des modèles déjà disponibles ou qui peuvent être créés.

a. Culture d'organe

Elle consiste à faire survivre quelques heures à quelques semaines un organe, un tissu ou un de leurs fragments, en essayant de conserver son intégrité et son architecture. Les principes communs à ce type de culture sont : l'adhérence de l'explant, un milieu de culture adapté et une oxygénation suffisante. Bien que la durée de conservation de l'échantillon soit très limitée, ce type de culture reste très intéressant puisqu'il permet de respecter au maximum l'intégrité de l'architecture du tissu et les interactions existantes entre les cellules ou entre cellules et matrice extracellulaire.

b. Culture primaire

Dans ce cas, les cellules sont obtenues soit par migration à partir d'un explant, soit par dissociation d'un tissu, puis placées en culture. Il s'agit le plus souvent d'un maintien en survie de ces cellules voire de division dans quelques cas. Ces modèles de primoculture sont particulièrement pertinents et pour certains types cellulaires ils restent le modèle de référence. Par exemple pour les hépatocytes dont les fonctions différenciées sont particulièrement labiles en culture. Mais leur préparation régulière, due à la durée limitée pendant laquelle ces cellules sont exploitables, est lourde et manque parfois de reproductibilité. De plus, la capacité de prolifération et la stabilité du phénotype différencié varient beaucoup d'un type cellulaire à l'autre et, pour un même type cellulaire, sont modulés par les conditions de culture.

c. Lignées cellulaires

Ces populations de cellules sont capables d'effectuer un nombre limité ou illimité de divisions en culture et sont ainsi maintenues par repiquages successifs. Une des principales limites à l'utilisation de cultures de cellules normales est leur courte durée de vie ou de fonctionnalité. Cependant, des modifications génétiques peuvent conférer aux cellules la possibilité de proliférer indéfiniment. Il s'agit alors de lignées cellulaires dites « continues », qui constituent les modèles les plus maniables pour le biologiste.

2. Lignées cellulaires continues

a. Présentation

Les lignées cellulaires dites « continues », ou immortalisées, sont des populations cellulaires capables d'effectuer un nombre illimité de divisions en culture et qui peuvent donc être maintenues par repiquages successifs. Ces lignées sont le plus souvent obtenues à partir de cellules d'un tissu tumoral, l'une des principales caractéristiques des cellules cancéreuses étant l'immortalité. Les cellules immortalisées peuvent également avoir deux autres origines : spontanées par échappement à la sénescence de cellules normales cultivées, ou immortalisation contrôlée par des agents physiques ou chimiques ou par la transfection d'oncogènes viraux [12].

Ces lignées constituent un outil facilement maniable, évitant la préparation de cellules fraîches à partir d'un tissu, permettant d'obtenir de grandes quantités de cellules et pouvant être congelées/décongelées « indéfiniment ». La constitution de collections, ou banques, de cellules cryoconservées dans l'azote liquide assure une réserve destinée à protéger les cellules contre les modifications de leur patrimoine génétique, le vieillissement *in vitro*, les risques de contamination (microbienne, fongique ou virale) ou encore des problèmes techniques de culture, et permet la récupération de l'ensemble des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles.

Cependant, ces lignées immortalisées sont souvent considérées à tort comme homogènes et stables dans le temps. En effet, l'immortalité de ces cellules est la conséquence d'altérations génétiques associées à une importante instabilité génotypique et caryotypique. Ces cellules évoluent généralement au cours des repiquages successifs et doivent être utilisées dans un intervalle de passages bien défini.

b. Applications

En pratique, les lignées cellulaires continues sont classiquement utilisées comme modèles d'étude *in vitro* en biologie et en biotechnologies. Cette approche *in vitro*, complémentaire de l'approche *in vivo*, est souvent indispensable pour aborder de nombreux domaines d'intérêt. Plus particulièrement, les lignées cellulaires étudiées dans ce travail sont utilisées lors d'études de physiopathologie et de pharmacotoxicologie.

i. Physiopathologie cardio-vasculaire

Les lignées cellulaires permettent d'étudier les fonctions cellulaires et leur régulation que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Par exemple, ce sont des modèles d'étude fréquents de certaines voies régulant le système cardio-vasculaire comme le métabolisme lipidique (ex : HepG2 [13], Kyn2 [14]). Ces modèles sont également fréquents dans l'étude de la signification physiologique ou pathologique de polymorphismes par transfection transitoire de l'allèle muté et de l'allèle sauvage dans une même population cellulaire (*in vitro reporter gene assays*).

Elles peuvent également servir de modèles pour étudier les mécanismes de différenciation cellulaire qui visent à déterminer quelles molécules et quels mécanismes moléculaires gouvernent le choix et les étapes du programme génétique de différenciation d'une cellule souche et contrôlent l'expression des fonctions cellulaires spécialisées des cellules filles différenciées. Par exemple, la lignée Thp1 permet d'étudier la différenciation des monocytes en macrophages [15]. Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation qu'il est possible d'analyser sur ces lignées cellulaires peuvent ensuite être recherchés *in vivo* chez l'animal.

ii. Pharmacotoxicologie

Ces modèles permettent d'une part d'étudier la réponse à un médicament. Par exemple, la lignée HepG2 a permis d'étudier le mécanisme de l'augmentation de la production d'ApoAI en réponse à un traitement par statine hypolipémiante [16]. Ils permettent également d'évaluer la toxicité de substances médicamenteuses (effets secondaires et interactions médicamenteuses) ou d'autres xénobiotiques contaminants de l'environnement sur le système cardio-vasculaire. La lignée U937 a par exemple été utilisée pour étudier les mécanismes de la réponse inflammatoire des macrophages à la pollution [17].

De plus, les lignées cellulaires permettent d'étudier les mécanismes de la biotransformation par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (XME) et par différents transporteurs des médicaments agissants sur le système cardio-vasculaire notamment en recherche pré-clinique lors du développement d'une nouvelle molécule [18]. Elles permettent aussi d'étudier la modulation de l'expression de ces enzymes/transporteurs par des médicaments cardio-vasculaires (ex : dipyridamole et ABCB1 dans les cellules Caco2 [19]) ou par des mécanismes non pharmacologiques (ex : stress oxydant et CYP3A4 dans les cellules K562 [20]).

Enfin, ces modèles sont utilisables pour déterminer de nouvelles cibles pharmacologiques. Par exemple, la modulation du taux de HDLc par action sur une séquence cible du gène du transporteur ABCA1 a été étudiée dans la lignée HepG2 [21].

iii. Biotechnologie

Les lignées en culture présentent un intérêt majeur dans les stratégies de criblage à haut débit actuellement développées dans les biotechnologies. Elles permettent en effet la production de protéines à hautes valeurs ajoutées comme des protéines recombinantes (ex : urokinase [22]). De plus, elles permettent d'obtenir des animaux transgéniques.

A l'heure actuelle, les lignées faisant l'objet de notre travail sont utilisées en biotechnologie de façon expérimentale exclusivement. Par exemple, la lignée Kyn2 a été utilisée pour produire de l'ApoE [14].

3. Environnement des cellules en culture

Il est possible de moduler l'environnement des lignées pour se rapprocher de la situation physiologique. Cette modulation peut se faire à deux niveaux, type de support sur lequel elles vont adhérer et composition du milieu de culture, et va intervenir dans les étapes essentielles de la vie cellulaire : la survie, la prolifération, la différenciation et la migration.

a. Adhérence

Il existe deux principaux types de cellules : adhérentes ou non adhérentes. Tandis que les cellules adhérentes (cellules étalées) vont devoir adhérer au support pour se développer, les cellules non adhérentes vont se développer en suspension dans le milieu (cellules sphériques). L'adhérence à un support est indispensable à la prolifération de la plupart des types cellulaires (fibroblastes, cellules épithéliales, ...) excepté pour les cellules circulantes ou certaines lignées transformées. En l'absence d'ancrage, certaines lignées sont incapables de proliférer, voire entrent en apoptose. Il existe plusieurs techniques de culture des cellules adhérentes :

- en monocouche sur plastique,
- sur support recouvert de protéines matricielles purifiées ou de matrices complexes,
- en monocouche sur filtre (membranes semi-perméables),
- tridimensionnelle (en sphéroïdes ou au sein de polymères : l'environnement est chimiquement et physiquement plus physiologique),
- en co-culture (ce qui permet de reconstituer de manière simplifiée les échanges existants entre plusieurs types cellulaires *in vivo*).

b. Milieu de culture

Les milieux de culture sont plus ou moins spécifiques de chaque lignée cellulaire et doivent imiter autant que possible les conditions auxquelles la cellule a été exposée *in vivo*. Ils sont préparés en suivant les recommandations des différents fournisseurs de lignées cellulaires, tel que l'*American Type Culture Collection* (ATCC) ou l'*European Collection of Cell Cultures* (ECACC).

Ces milieux sont classiquement composés d'une solution saline tamponnée complexe, qui contient les nutriments et les ions nécessaires au métabolisme cellulaire, et de sérum de veau fœtal (SVF) qui permet la croissance cellulaire. On ajoute également des antibiotiques et des antifongiques (Tableau III).

Tableau III : Composition type d'un milieu de culture.

	Composants	**Rôles**
Milieu nutritif (ex : RPMI, MEM)	Glucose	Principale source d'énergie
	Acides aminés dont glutamine	Synthèse protéique Energie
	Sels inorganiques et oligo-éléments	Potentiel de membrane Maintien du pH Balance osmotique Réactions enzymatiques Echanges membranaires ...
	Vitamines hydrosolubles	Précurseurs de co-enzymes
	Rouge de phénol	Indicateur de pH
SVF	Facteurs de croissance	Croissance cellulaire
	Lipides	Structure (membranes) Energie
	Vitamines liposolubles	
	Protéines	Transport Adhérence
Antibiotiques & Antifongiques		Evitent la croissance bactérienne et fongique dans ce milieu favorable à leur développement

Les cellules sont cultivées dans des flasques incubées dans une étuve à 37°C dans une atmosphère humide enrichie de 5% de CO_2. La densité cellulaire et la fréquence des repiquages sont propres à chaque type cellulaire.

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

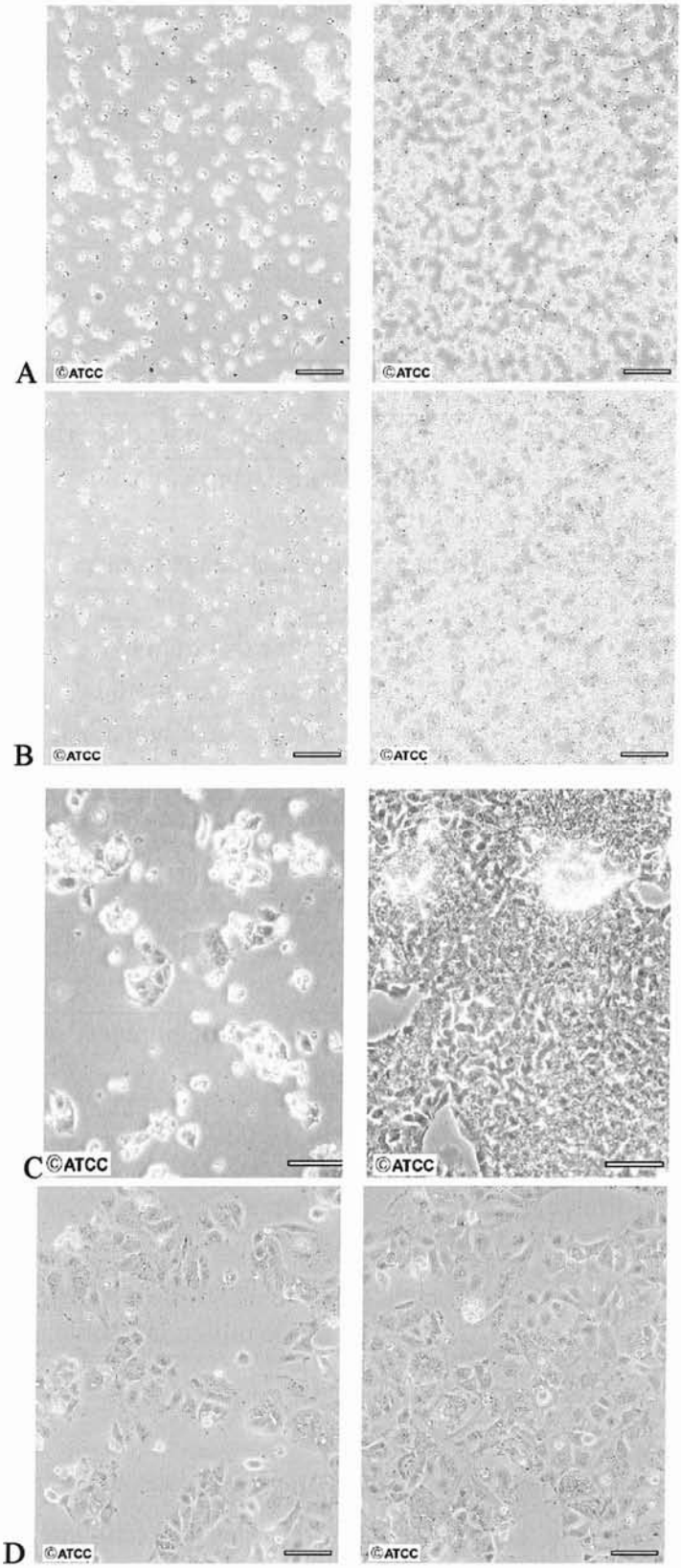


Figure 1 : Morphologie à faible densité (gauche) et à forte densité (droite) de lignées monocytaire (Thp1, A), myélocytaire (HL60, B), hépatocytaire (HepG2, C) et entérocytaire (Caco2, D). Barre d'échelle = 100 µm.

4. Présentation des lignées cellulaires étudiées

Toutes les lignées cellulaires étudiées ici ont pour origine une tumeur chez l'homme. Nous avons choisi les lignées leucémiques non adhérentes monocytaires Thp1 et U937 et myélocytaires HL60 et K562. Nous nous intéresserons également aux lignées adhérentes hépatocytaires HepG2 et Kyn2, et entérocytaire Caco2. Ces lignées possèdent des caractéristiques différentes y compris au niveau morphologique (Figure 1).

a. Modèles de cellules non adhérentes

i. Lignée Thp1

La lignée monocytaire Thp1 a été obtenue à partir du sang d'un patient porteur d'une leucémie monocytaire aiguë [23]. En culture, ces cellules en suspension sont individualisées ou poussent parfois sous la forme d'agrégats. Elles sont généralement utilisées sous leur forme différenciée, en macrophages ou en cellules spumeuses, comme modèles d'étude de l'athérosclérose. En effet, après induction par les esters de phorbol (Phorbol 12-myristate 13-acetate ou PMA) les cellules deviennent adhérentes et présentent en quelques jours des propriétés macrophagiques. Ensuite, l'addition de LDL acétylés ou oxydés les différencient en cellules spumeuses. Cette lignée a servi, par exemple, à l'étude de la régulation de l'expression d'un ensemble de protéines afin de proposer de nouveaux biomarqueurs candidats de l'athérosclérose [24].

ii. Lignée U937

Cette lignée leucémique est dérivée du prélèvement pleural d'un patient caucasien présentant un lymphome hystiocytaire généralisé [25]. Les cellules sont individualisées et sont sphériques à polygonales. Comme Thp1, ces cellules promonocytaires sont utilisées pour former un modèle de macrophages après induction par du PMA ou de cellules spumeuses par addition de LDL acétylés ou oxydés.

iii. Lignée HL60

La lignée HL60 est issue du sang périphérique d'une femme caucasienne présentant une leucémie aiguë promyéloblastique [26]. Ces cellules présentent une morphologie de promyélocytes neutrophiliques et sont sphériques et individualisées. Elles peuvent être soit différenciées en neutrophiles matures (dimethylsulfoxide, DMSO) soit en macrophages (PMA). Ces cellules présentent spontanément des activités de phagocytose et répondent aux stimuli chimiotactiques. Cette lignée permet notamment l'étude des événements moléculaires liés à la différenciation myéloïde et l'étude des effets des éléments physiologiques, pharmacologiques et virologiques sur ce processus.

iv. Lignée K562

Cette lignée a été obtenue à partir d'une patiente porteuse d'une leucémie myéloïde chronique. Elle présente, de façon non constante, le chromosome de Philadelphie [27]. Ces cellules en suspension peuvent être à induites à se différencier vers les lignées érythroïde, granulocytaire ou monocytaire suivant la nature de l'inducteur. Cette lignée est également très utilisée comme cellule tumorale cible *in vitro* dans les essais de détermination de l'activité cytotoxique des cellules *natural killer*.

b. Modèles hépatiques

Le foie joue un rôle primordial dans l'organisme. Il intervient dans de nombreuses fonctions métaboliques dont le métabolisme des glucides, la production de protéines plasmatiques, et la détoxification de composés endogènes et exogènes. Il est donc important d'avoir des modèles cellulaires permettant :

- d'analyser les mécanismes impliqués dans la régulation des gènes tissulaires spécifiques,
- d'étudier les mécanismes de certaines pathologies hépatiques,
- d'évaluer l'hépatotoxicité et le métabolisme des médicaments,
- d'obtenir une source possible de cellules pour la thérapie cellulaire hépatique.

Il existe une grande diversité de modèles en culture d'hépatocytes normaux et immortalisés dont HepG2 et Kyn2.

i. Lignée HepG2

Ces cellules adhérent au support et prennent une forme de cellules épithéliales poussant en monocouche. Elles ont été isolées initialement d'un carcinome hépatocellulaire d'un adolescent caucasien [28]. Cette lignée est particulièrement utilisée en pharmacotoxicologie pour étudier la transformation des substances exo ou endogènes par les cytochromes P450 (CYP450) et dans les études d'induction de ces CYP450. En effet, ces CYP450 sont particulièrement exprimés dans ce type cellulaire. Un de leurs inconvénients est une faible stabilité à confluence qui nécessite de les utiliser sur de cours passages.

ii. Lignée Kyn2

Cette lignée de cellules adhérentes a été obtenue d'un patient asiatique atteint d'un carcinome hépatocellulaire [29]. Elle produit des protéines hépatiques caractéristiques comme l'albumine, le fibrinogène et les apolipoprotéines [30]. Cette lignée cellulaire, peu utilisée, représente un modèle alternatif à HepG2. C'est un bon modèle pour étudier les bases moléculaires de l'invasion tumorale et de la formation des métastases dans les carcinomes hépatiques [31]. Elle peut également être utilisée pour l'étude du métabolisme des médicaments [32] et de la régulation de l'expression de protéines telles que l'apolipoprotéine E [14].

c. Modèle intestinal

i. Lignée Caco2

La lignée Caco2 dérive d'un adénocarcinome de colon d'un homme caucasien [33]. Ces cellules sont adhérentes et présentent spontanément à confluence de nombreuses caractéristiques de différenciation entérocytaire comme la bordure en brosse. Cependant, certaines caractéristiques font défaut. Par exemple, l'expression de certains paramètres du métabolisme des lipides est imparfaitement reproduite mais peut être améliorée en fonction de la nature du support (filtre semi-perméable, matrice extracellulaire, co-culture, ...). Plusieurs clones ont été établis à partir de cette lignée (ex : TC7). Ils présentent chacun des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles entérocytaires plus ou moins marquées [12]. Cette lignée est très utilisée comme système modèle dans l'étude des interactions bactéries/intestin, de la perméabilité et des activités de transport de l'épithélium intestinal et aussi pour des études de métabolisme du médicament.

II. OBJECTIF

Les maladies cardio-vasculaires sont des pathologies complexes, multifactorielles et d'importance majeure en santé publique. Les lignées cellulaires continues sont fréquemment utilisées comme modèles d'étude *in vitro* afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués. Elles sont également utilisées en pharmacotoxicologie pour comprendre les mécanismes d'action des médicaments, leur biotransformation et leurs effets toxiques ainsi que pour proposer de nouvelles cibles thérapeutiques. Les lignées hématopoïétiques, hépatiques et intestinales sont particulièrement utilisées lors de ces études.
A notre connaissance, peu de choses sont connues sur le profil génétique de ces lignées excepté pour quelques enzymes du métabolisme des médicaments. Or, certains polymorphismes de gènes importants en physiopathologie cardio-vasculaire affecteraient l'expression de ces gènes. Il est vraisemblable que de tels polymorphismes soient présents dans les lignées cellulaires continues et pourraient ainsi influencer les résultats des études utilisant ces modèles *in vitro*.

Dans ce travail, notre objectif est d'établir le profil génétique de sept lignées cellulaires utilisées comme modèles d'étude en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardio-vasculaires pour un ensemble de gènes polymorphes d'intérêt associés au métabolisme lipidique, à l'inflammation ou encore à la pression artérielle, et impliqués dans l'initiation ou le développement des pathologies cardio-vasculaires. Ce travail pourra constituer une base de données utile pour les chercheurs lors du choix d'une lignée pour un travail donné et lors de l'interprétation des résultats observés avec ces modèles cellulaires, notamment pour proposer une explication aux contradictions parfois observées entre les approches *in vitro* et *in vivo*.

III. MATERIELS ET METHODES

A. Culture cellulaire

Après décongélation, les lignées sont mises en culture une à deux semaines pour obtenir une quantité suffisante de cellules. Les cellules sont cultivées en flasques dans un milieu spécifique et placées dans une étuve dans une atmosphère à 37°C enrichie de 5% de CO_2. La densité cellulaire et la fréquence des repiquages sont propres à chaque type cellulaire.

1. Préparation des milieux de culture

Les milieux de culture spécifiques à chaque lignée sont préparés sous hotte à flux laminaire à partir d'un milieu nutritif RPMI, MEM ou DMEM (Invitrogen®) correctement supplémenté en sérum de veau fœtal (Bio West®) et en différents additifs dont des antibiotiques et des antifongiques (Sigma®). L'annexe 2 présente la composition des différents milieux utilisés pour ce travail.

2. Décongélation d'une lignée cellulaire

Les cellules sont conservées dans l'azote liquide en cryotube (VWR®) dans 90 % de milieu complet (ou de SVF) et 10% de DMSO (Invitrogen®). La décongélation doit-être le plus rapide possible pour éviter la souffrance cellulaire. Le protocole correspondant est présenté en annexe 3.

3. Numération cellulaire

La numération se fait en utilisant des plaques de verres calibrées appelées hématimètres : les cellules de Malassez, Thoma ou Neubauer. La lame utilisée ici est une lame de Malassez. Les prélèvements riches en cellules sont comptés après une dilution adéquate. Le protocole correspondant est présenté en annexe 4.

4. Repiquage

Les cellules sont cultivées dans 20 ml de milieu complet dans des flasques de 75 cm^2 (VWR®). La densité cellulaire optimale pour la croissance des cellules et la fréquence des passages sont propres à chaque type cellulaire. En moyenne, les cellules en suspension sont repiquées tous les deux à trois jours et les cellules adhérentes une à deux fois par semaine.

a. Cellules en suspension

Le repiquage se fait par dilution direct. Le nombre de flasques nécessaires est évalué par la croissance des cellules observée au microscope. Pour une dilution 1 : x, préparer x flasques.

- Sortir la/les flasque(s) de l'étuve, observer les cellules à l'œil nu et au microscope,
- Mettre dans chaque flasque environ 18 mL de milieu complet,
- Compléter chaque flasque par : volume total de suspension cellulaire/x,
- Homogénéiser et placer les flasques à l'étuve, 5% de CO_2, 37 °C.

b. Cellules adhérentes

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

B. Extraction de l'ADN génomique

De nombreuses méthodes permettent d'extraire de l'ADN génomique. Ces méthodes sont soit manuelles (ex : Kits d'extraction Qiagen®, méthode de Miller) soit automatisées (ex : MagNAPure®, Roche Diagnostics®). Nous avons choisi ici d'adapter à nos cultures cellulaires la technique de Miller [34] qui permet habituellement l'extraction d'ADN à partir de sang total.

1. Principe

Le principe est celui d'un « salting out », c'est à dire d'une déshydratation suivie d'une précipitation des protéines par une solution de chlorure de sodium saturée. Après précipitation des protéines, l'ADN est précipité par de l'éthanol puis repris en suspension.

2. Matériels

- Agitateur rotatif et étuve à 37°C
- Centrifugeuse thermo-réglable (CR3i, Jouan®)
- Pipettes Pasteur

3. Réactifs

- Tampon STE (sodium-tris-EDTA, hypotonique)
- Tampon de lyse
- Tampon d'extraction
- Solution de protéinase K [1mg/ml]
- Ethanol 70%

Après préparation (cf Annexe 5), les solutions de travail sont filtrées sur membrane et stérilisés en autoclave 45 minutes à 121°C (sauf la solution de protéinase K). Les réactifs sont conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

4. Protocole

a. Isolement des cellules

- Utiliser une (cellules flottantes) ou deux (cellules adhérentes) flasques de culture, pour obtenir 5.10^6 à 1.10^8 cellules par lignée,
- Transvaser les cellules et leur milieu dans un tube de 15 ml, centrifuger 5 minutes à 400g,
- Laver les cellules dans 5 à 10 ml de PBS, centrifuger,
- Recommencer une fois,
- Reprendre les cellules dans 5 ml de PBS et procéder au comptage des cellules.

b. Dégradation des protéines et des membranes

- Pour chaque tube de cellule, ajouter au culot:
    - 3 ml de tampon de lyse,
    - 1 ml de protéinase K [1mg/ml],
    - 200 µl de détergent anionique SDS 10%,
- Entourer les tubes de Parafilm® et homogénéiser par retournements,
- Incuber 16 heures à 37°C sous agitation rotative. Dans un premier temps la solution de lyse et le SDS vont détruire les membranes. Dans un deuxième temps, la protéinase K va hydrolyser les protéines.

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

- Ajouter par tube 2,27 ml de NaCl 6M et 3,4 ml de tampon de lyse,
- Homogénéiser par retournements,
- Centrifuger 20 minutes, à 4°C, 1500g. Le NaCl va provoquer une déshydratation des protéines, entraînant une interaction hydrophobe entre elles et leur précipitation.

d. Précipitation de la pelote d'ADN

A partir de cette étape, travailler dans la glace.

- Transvaser délicatement le surnageant dans un tube de 50 ml contenant 12 ml d'éthanol absolu ayant passé une nuit à 4°C (éviter de prendre le précipité),
- Mélanger lentement par rotation afin de précipiter la pelote d'ADN,
- Récupérer la pelote à l'aide d'une pipette pasteur soudée à l'extrémité,
- Agiter doucement la pelote accrochée à la pipette Pasteur dans un tube contenant 8 ml d'éthanol à 70% ayant passé la nuit à 4°C afin de la rincer.

e. Solubilisation de l'ADN

Elle se fait en tube Eppendorf dans 500 µl de tampon d'extraction (TE) par agitation rotative à 37°C pendant 24 à 48h.

f. Détermination de la concentration en ADN

L'échantillon est dilué au $1/40^e$ et la lecture de la densité optique à 260 nm (DO_{260}) est effectuée grâce à un Spectrophotomètre (Specord 205, Analytik Jena®). La concentration de la solution mère (C) est donnée par la formule suivante :

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

Avec D =Facteur de dilution

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

g. Stockage de l'ADN

Stockage en plusieurs aliquots à -20°C.

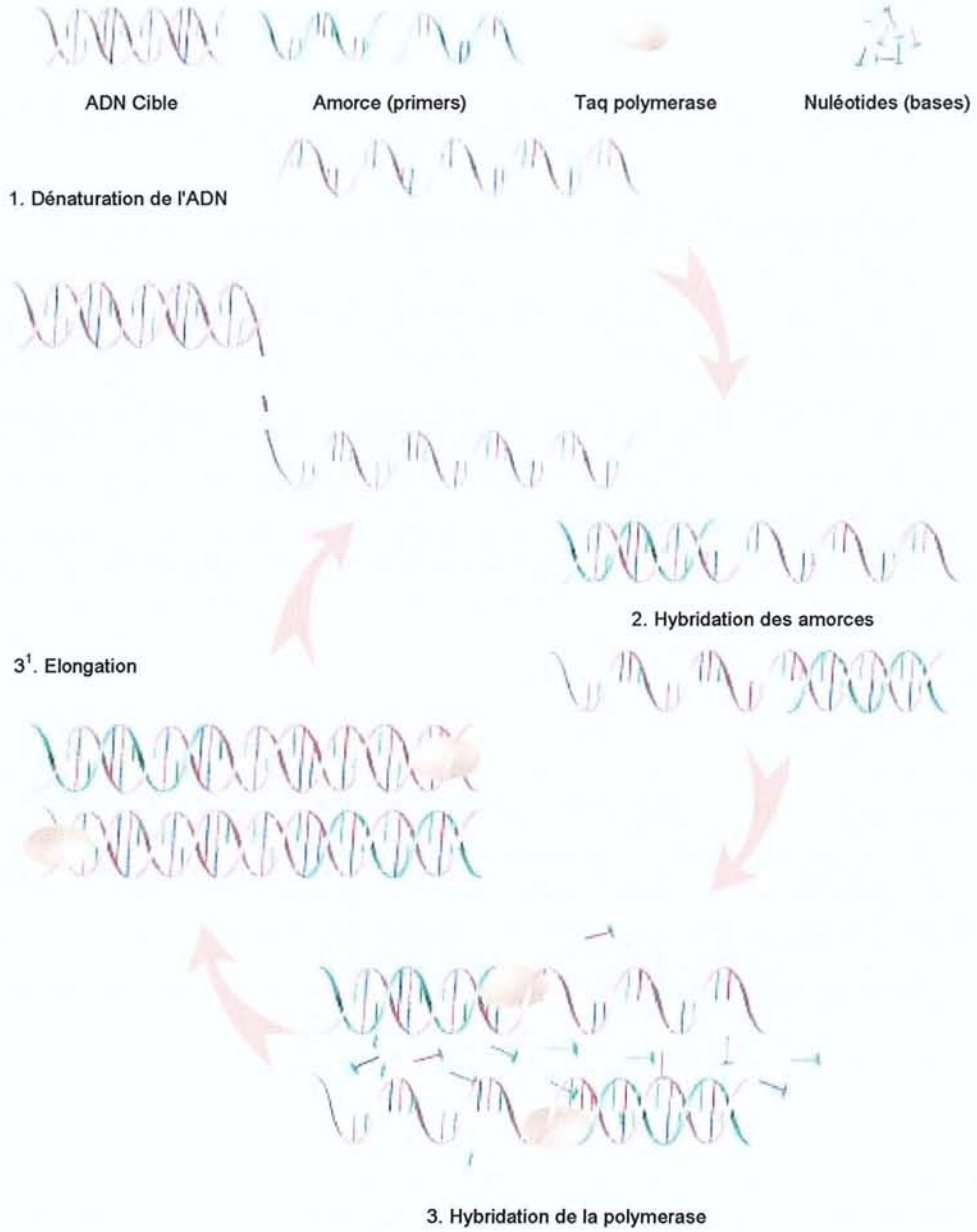


Figure 2 : Principe d'un cycle de PCR.

C. PCR Multiplex-révélation colorimétrique

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

1. PCR

a. Principe

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

Une PCR commence par une étape de dénaturation initiale, suivie d'une répétition d'un cycle de 3 phases et se termine par une étape d'élongation finale. Le cycle triphasique, répété 30 à 45 fois, est constitué des étapes suivantes (Figure 2) :

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

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

b. Matériel

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

c. Mélange réactionnel

Les amorces sont biotinylées. Nous obtenons ainsi des fragments d'ADN amplifiés également marqués à la biotine ce qui permettra ultérieurement de faire une révélation colorimétrique.
Le mélange réactionnel diffère en fonction du Multiplex (Tableau IV). La quantité d'ADN utilisée est de 500 ng par échantillon. Le pré-mixe (Roche®) est prêt à l'emploi et contient la Taq polymérase, les dNTP, le $MgCl_2$, etc ...

Tableau IV : Composition du mixe réactionnel pour un échantillon.

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

d. Protocole

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

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

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

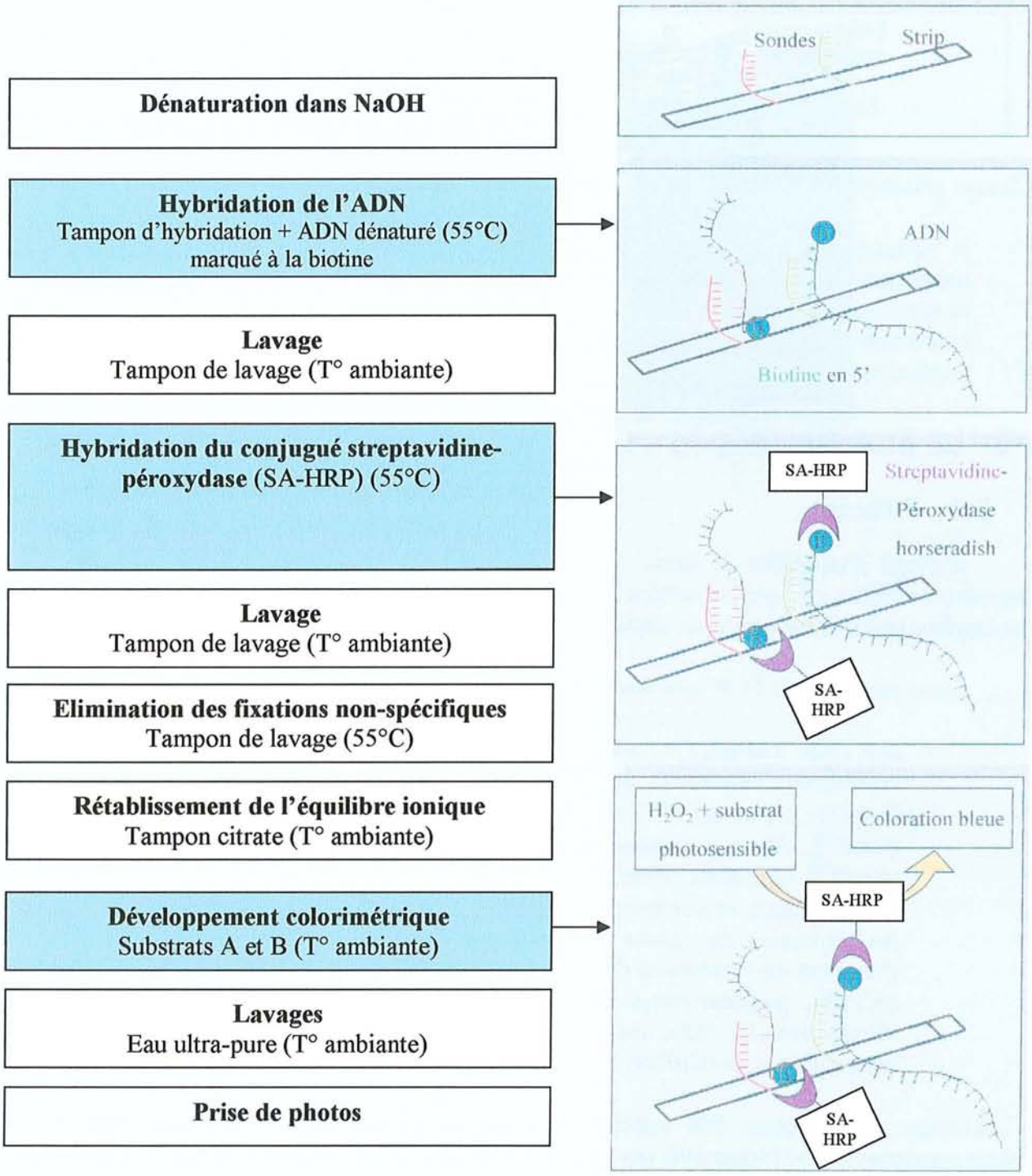


Figure 3 : Principe de la détection colorimétrique associée à la PCR Multiplex.

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

2. Détection

a. Principe

La détection est basée sur le principe d'un dot-blot inversé : les produits de PCR marqués à la biotine sont dénaturés et fixés à des sondes allèle-spécifique immobilisées sur des bandelettes. Ces bandelettes, ou « *strips* », sont des membranes de nylon sur lesquelles ont été fixées par action d'UV les sondes complémentaires des différents polymorphismes des gènes étudiés. Pour un même locus, deux sondes sont fixés sur le strip, l'un correspondant à l'allèle sauvage, l'autre à l'allèle muté. Après fixation et lavage, on ajoute un complexe streptavidine-peroxydase (SA-HRP) qui se fixe à la biotine des fragments d'ADN hybridés. La révélation se fait ensuite par addition de peroxyde d'hydrogène (substrat A) et d'un réactif incolore (tétraméthylbenzidine ou TMB, substrat B) qui est alors oxydé en un complexe bleu (Figure 3).

b. Matériel

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

c. Réactifs

- SSPE : solution de sulfate de sodium EDTA
- SDS : sodium dodécyl sulfate
- Solution de dénaturation à base de NaOH
- SA-HRP : streptavidine-horseradish peroxydase
- Substrat A : H_2O_2 dans une solution de citrate
- Substrat B : 3,3',5,5' tétraméthyl-benzidine dans du diméthyl-formamide

d. Tampons

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

Tampons	Multiplex II	Multiplex III
Tampon d'hybridation : - SSPE - SDS	 4X 0.5%	 3X 0.5%
Tampon de lavage : - SSPE - SDS	 2X 0.5%	 1.5X 0.5%
Tampon citrate	Citrate 0.5X	Citrate 1X

e. Protocole

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

Etape	Multiplex II	Multiplex III
Dénaturation	Membrane + 3 ml tampon de lavage	
	agitation 50°C, 10 min, aspirer	
	Préparer : solution dénaturante (20 µl) + produit PCR (20 µl)	
Hybridation (SA-HRP)	3ml tampon hybridation + échantillons dénaturés	5ml tampon hybridation + échantillons dénaturés
	agitation 50°C, 20 min, aspirer	*agitation 55°C, 15 min, aspirer*
	3 ml tampon lavage	5 ml tampon lavage
	agitation T° ambiante, 2 min, aspirer	
	Préparer solution de conjugaison : 123ml tampon hybridation + 515µl SA-HRP	Préparer la solution de conjugaison : 205ml tampon hybridation + 1025µl SA-HRP
	3 ml solution de conjugaison	5 ml solution conjugaison
	agitation 50°C, 5 min, aspirer	*agitation 55°C, 5 min, aspirer*
	3 ml tampon lavage	5 ml tampon lavage
	agitation T° ambiante, 2 min, aspirer	
Etape	**Multiplex II**	**Multiplex III**

(suite)	3 ml tampon lavage	5 ml tampon lavage
	agitation 50°C, 12 min, aspirer	*agitation 55°C, 12 min, aspirer*
	(Conditions stringentes : permet élimination des fixations non spécifiques mais change l'équilibre ionique)	
		5ml tampon lavage
		agitation T° ambiante, 2 min, aspirer
	3 ml tampon citrate	5 ml de tampon citrate
	(Permet le rétablissement de l'équilibre ionique)	
	agitation T° ambiante, 5 min, aspirer	
Développement colorimétrique	Préparation extemporanée de la solution de développement (99,4ml substrat A + 23,6ml substrat B) et laisser à l'abri de la lumière	Préparation extemporanée de la solution de développement (176,3ml substrat A + 29,9ml substrat B) et laisser à l'abri de la lumière
	3 ml solution de développement	5 ml solution de développement
	agitation T° ambiante, 10 min, aspirer	*agitation T° ambiante, 8 min, aspirer*
	Rinçage avec 5ml d'eau ultra-pure (répéter 2 fois)	
	agitation T° ambiante, 5 min, aspirer	
Lecture	Placer les membranes sur les imprimés de lecture (10 strips/imprimé) et prendre une photo	
	Laisser sécher la nuit à T° ambiante à l'abri de la lumière, puis les stocker à 4°C	

3. Lecture des résultats

Les bandelettes sont placées sur des supports adaptés puis pris en photo et lues en duplicat. Les résultats sont codés sous la forme 1 lorsque l'allèle est présent et 0 lorsqu'il est absent. La sonde complémentaire de l'allèle sauvage est située en haut. Une bande bleue en haut indique donc la présence de l'allèle sauvage. La sonde complémentaire de l'allèle muté est située en bas, et une bande bleue en bas signe la présence de l'allèle muté. Si l'individu est hétérozygote pour le polymorphisme considéré, on aura alors 2 bandes, une en haut et une en bas (Figure 4).

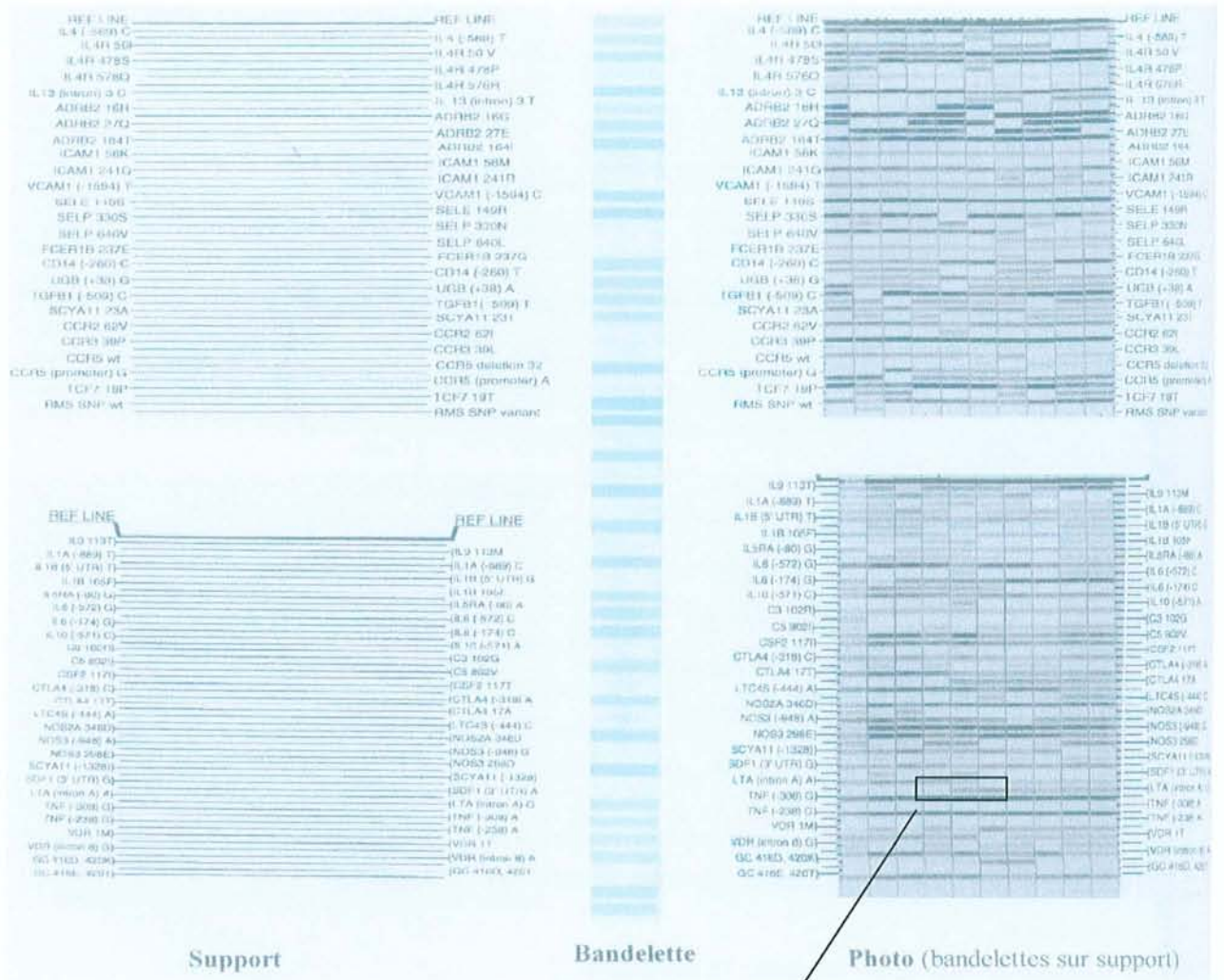


Figure 4 : Lecture des bandelettes. Exemple du polymorphisme A256g du gène codant la lymphotoxine alpha (*LTA*).

En plus des polymorphismes du Multiplex, nous avons génotypé des polymorphismes de gènes codant certains transporteurs ABC. Nous avons utilisé deux techniques développées grâce à des collaborations avec le Dr Véra Ribeiro Marques (Faro, Portugal) et le Pr Gerd Schmitz (Regensburg, Allemagne) : PCR-RFLP et technologie TaqMan.

D. PCR-RFLP

Afin de génotyper nos lignées pour 5 polymorphismes du gène codant le transporteur ABCB1, soit T-129C, G1199A, C1236T, G2677T/A et C3435T, nous avons été amené à réaliser une technique de PCR-RFLP (réaction de polymérisation en chaîne – polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Cette technique est basée sur le fait que la présence de l'allèle muté crée ou entraîne la disparition d'un site de restriction pour une enzyme de restriction donnée. On amplifie par PCR un segment d'ADN spécifique de la région d'intérêt contenant la mutation ponctuelle étudiée. Le produit d'amplification est ensuite digéré par une enzyme de restriction adéquate et les produits de digestion sont séparés par électrophorèse. Les profils de digestion permettent de constater la présence ou l'absence d'une coupure enzymatique du produit amplifié, révélant la présence ou l'absence du polymorphisme.
Nous nous sommes basés sur des protocoles de PCR-RFLP existants dans la littérature [35, 36] ou mis en place dans l'équipe.

1. PCR

a. Principe

Le principe est le même que celui décrit précédemment.

b. Protocole

Pour un échantillon d'1 µL d'ADN (100 ng/µL), le mélange réactionnel contient 1,5 µL de tampon de l'enzyme (Sigma®), 1,5 µL de dNTPs à 2mM (Roche®, 100 mM), 0,15 µL d'amorces sens (Proligo®) et antisens à 20 µM (Proligo®, 100 µM), 10,61 µL d'eau (Molecular Grade Water, Eppendorf®) et 0,09 µL de Taq polymérase (Roche®, 5U/µL).
Etant donné la proximité des polymorphismes (37 paires de bases, ou pb), une seule PCR est réalisée pour les polymorphismes G1199A et C1236T. Les programmes de PCR sont présentés dans le tableau VI et les séquences des amorces utilisées dans le tableau VII.

Tableau VI : Programmes de PCR.

Polymorphisme	Nombre de cycles	Température (°C)	Durée
T-129C, G1199A et C1236T	1	94.0	1 min
	35	92.5	30 sec
		53.0	45 sec
		72.0	45 sec
	1	72.0	2 min
	1	4.0	3 min
G2677T/A	1	94.0	1 min
	6	92.5	30 sec
		53.0	45 sec
		72.0	45 sec
	21	92.5	30 sec
		52.0	45 sec
		72.0	45 sec
	16	92.5	30 sec
		51.0	45 sec
		72.0	45 sec
	1	72.0	2 min
	1	4.0	3 min
C3435T	1	94.0	1 min
	35	92.5	30 sec
		63.0	45 sec
		72.0	45 sec
	1	72.0	2 min
	1	4.0	3 min

Tableau VII : Séquences des amorces.

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

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

2. Digestion enzymatique (RFLP)

a. Principe

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

b. Protocole

Les amplicons subissent une digestion enzymatique dans un volume final de 10 µL. Le mélange réactionnel contient 5 µL de produit de PCR, 3,85 µL d'eau, 1 µL de tampon de l'enzyme et 0,15 µL d'enzyme de restriction (Fermentas® sauf MspA1I (Promega ®)). Pour le polymorphisme T-129C, il est ajouté 0,1 µL de BSA (Promega ®) dans le milieu réactionnel. Le polymorphisme G2677T/A étant tri-allélique, une première digestion est effectuée pour déterminer la présence ou l'absence d'un allèle muté. En cas de mutation, une deuxième digestion est effectuée pour déterminer si la mutation est un T ou un A. Les enzymes de restriction la longueur des fragments obtenus après digestion enzymatique sont présentées dans le tableau VIII.

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

Polymorphisme	Enzyme de restriction	Site de restriction	Longueur fragment amplifié	Longueur fragments obtenus
T-129C	MspA1I	TCGAG**C**AG↓CGGCTCTTCCAA	197 pb	148 + 49 pb
G1199A	BseNI	CTCCA**G**↓TTACCCATC	345 pb	321 +24 pb
C1236T	BsuRI	TGAAGGG↓**C**CTGAACCTGAAG GTGCAGAGTGGGCAGACGGTG GCAGACGGTGG↓CCCTGGTT	345 pb	230 + 80 + 35 pb
G2677W	Alw21I	T**G**CT↓CGG AAG…	108 pb	87 +21 pb
Si mutation en 2677 pour différencier T et A	RsaI	GT↓A CCC… …AACTAGAAGG T↓**A**CT CGG…	108 pb	84 + 22 +2 pb
C3435T	MboI	…GTCACAGGAA GA↓GAT**C**GTGAG	140 pb	112 +28 pb

X : localisation du polymorphisme

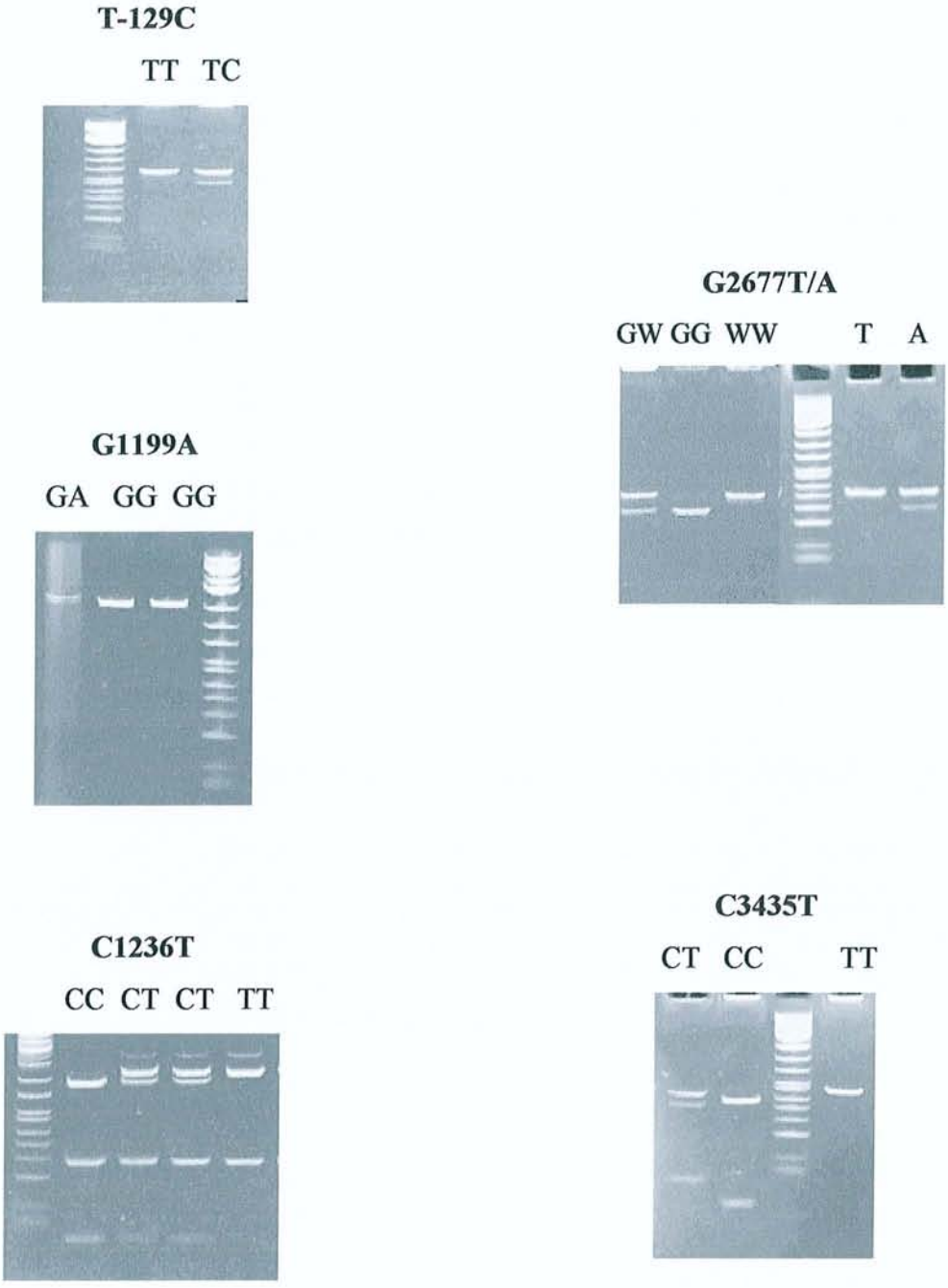


Figure 5 : Profils de restriction obtenus pour les 5 polymorphismes étudiés par PCR-RFLP.

3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

a. Principe

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

b. Protocole

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

Le gel utilisé pour ce travail est un gel à 10% composé de : 3,15 mL d'eau, 1,125 mL d'acryl à 40%, 450 µL de TBE 10X, 45 µL de persulfate à 10% et 4,5 µL de TEMED. Une fois le gel polymérisé, 5µL d'échantillon mélangés à 1 µL de tampon de charge (Promega®, 6X) sont déposés. Un puits du gel est réservé au dépôt d'un marqueur de taille (ϕX174 DNA/*Hinf* I Promega®).

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

La figure 5 présente les profils de restriction obtenus pour les différents génotypes de chaque polymorphisme.

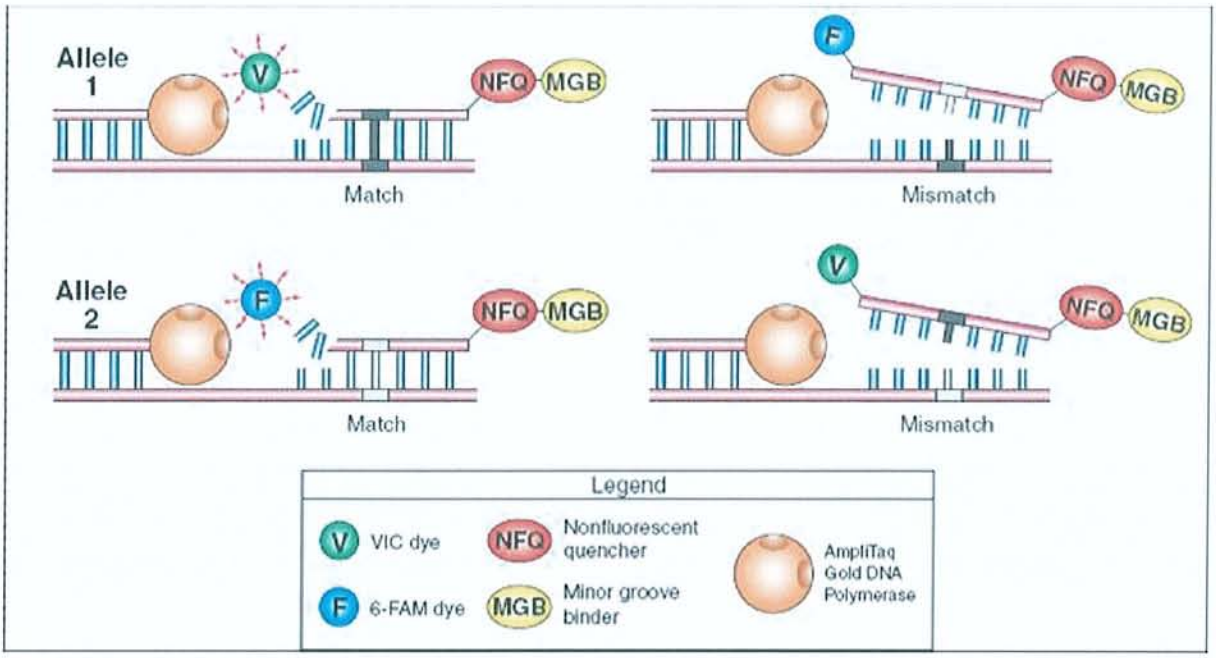


Figure 6 : Résultats des appariements et des misappariements entre les séquences cibles et sondes dans les essais utilisant la technologie TaqMan (d'après le protocole TaqMan® SNP Genotyping Assays).

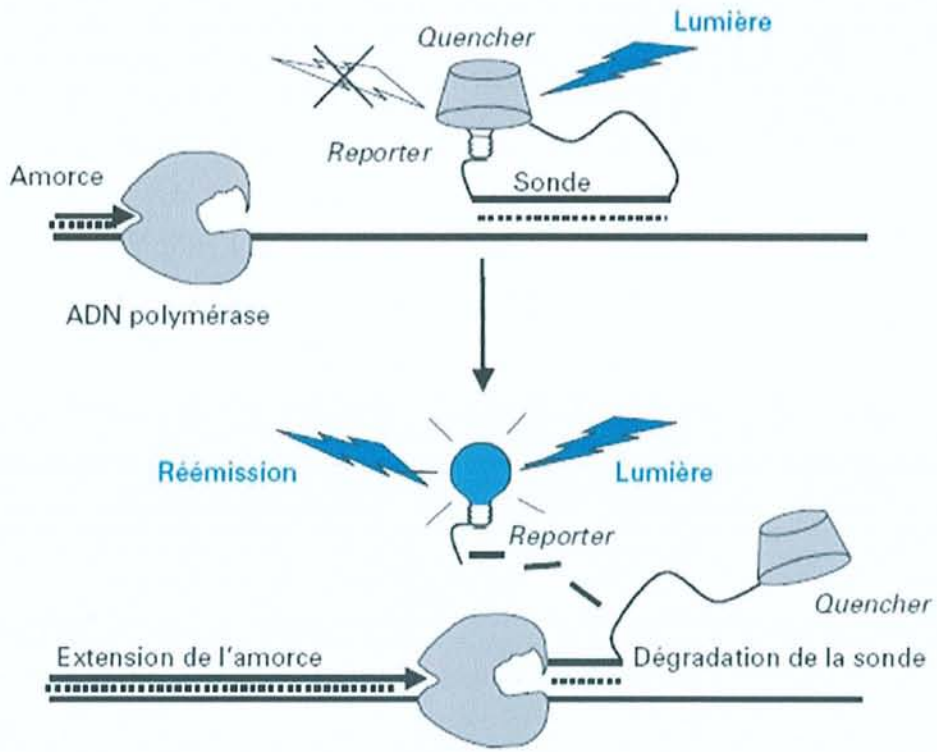


Figure 7 : Utilisation de la fluorescence dans la technologie TaqMan [3].

E. Génotypage par technique TaqMan

La dernière technique utilisée pour détecter 12 polymorphismes de 3 transporteurs ABC est une technique quantitative de PCR en temps réel utilisant la technologie TaqMan.

1. Principe

La PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent au cours de la réaction d'amplification. Le signal fluorescent est directement proportionnel à la quantité de produits de PCR générés. En mesurant l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la formation des produits de PCR pendant la phase exponentielle (phase au cours de laquelle la quantité de produits amplifiés est en corrélation directe avec la quantité initiale de matrice). Les produits d'amplification peuvent être détectés selon deux grands principes : par marquage non spécifique avec des agents se liant à l'ADN double brin (Sybr Green I) et par marquage spécifique du produit de PCR à l'aide d'une ou deux sonde(s) fluorescente(s) (Sondes TaqMan ou balises moléculaires) [3].
Nous avons utilisé ici deux sondes discriminantes, VIC et FAM. Dans ce cas de figure, la PCR requiert deux amorces oligonucléotidiques pour amplifier la séquence d'intérêt et deux sondes TaqMan : l'une s'hybridant à l'allèle sauvage, l'autre à l'allèle variant. Chaque sonde TaqMan renferme un fluorochrome à l'extrémité 5' spécifique de chaque type d'allèle (VIC et FAM), un *quencher* non fluorescent (NFQ) à l'extrémité 3' et une molécule (*Minor Grove Binder,* MGB) qui s'insère dans le petit sillon de la double hélice formée par le duplex ADN cible – sonde spécifique et le stabilise (Figure 6). Cette stabilisation du complexe ADN cible-sonde va de pair avec la température de fusion du complexe (Tm). Ainsi, le Tm d'une sonde parfaitement hybridée avec le produit de PCR sera plus élevé que celui d'une sonde s'hybridant imparfaitement. Ce phénomène est accentué par l'utilisation du MGB qui va déstabiliser un duplex imparfait et donc faire chuter le Tm. Au début de l'élongation, les sondes spécifiques d'allèle s'hybrident spécifiquement à la matrice, entre les deux amorces nécessaires à l'amplification. La proximité du fluorochrome et du *quencher* empêche la détection de fluorescence. Au cours de l'étape d'élongation de la PCR, la Taq polymérase dégrade la sonde hybridée, ce qui entraîne une émission de fluorescence (Figure 7).

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

2. Matériel

- Thermocycleur - système de détection : 7900 HAT Abi Prism (Applied Biosystem®)
- Thermocycleurs Primus (MWG AG Biotech®)
- Automate dispatcheur : Biotek® FX Stacker 10 Carousel (Beckman Coulter®)

3. Réactifs

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

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

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

4. Protocole

Les conditions de PCR sont les mêmes quelque soit le polymorphisme étudié. Seul le mixe avec les sondes est spécifique de chaque polymorphisme. Le protocole est résumé sur la figure suivante (Figure 8) :

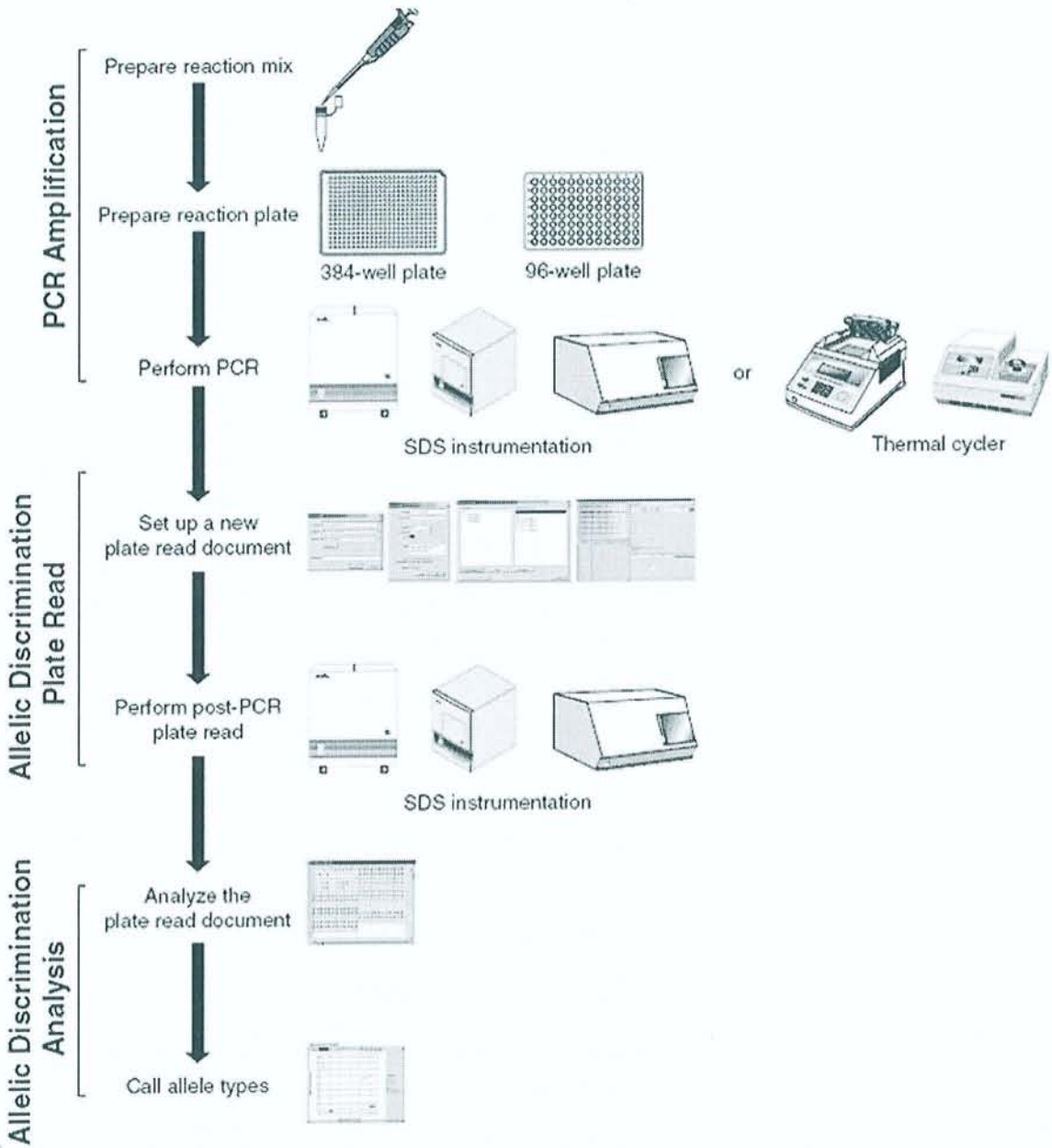


Figure 8 : Résumé de la procédure de génotypage utilisant la technologie TaqMan (d'après le protocole TaqMan® SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems).

a. Préparation des échantillons et du mixe de PCR

40 µL de chaque échantillon d'ADN (10 ng/µL) sont déposés dans des plaques 96 puits qui vont servir pour plusieurs PCR. Le mixe est préparé dans un godet de 40 ml.

La composition pour un échantillon est :

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

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

b. Programme de PCR

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

- 50°C, 2 min
- 95°C, 10 min
- Puis 55 fois : [95°C, 15 sec / 60°C, 1 min]
- 8°C, infini

La PCR est effectuée soit dans le thermocycleur 7900 HAT Abiprism® (Applied Biosystem®), soit dans un thermocycleur Primus (MWG AG Biotech®).

c. Lecture des résultats

Cette lecture est faite grâce au logiciel SDS 2.1 de l'ordinateur lié au thermocycleur Applied Biosystem®. Chaque échantillon est représenté par un point. On définit quel type de fluorescence est associé à chaque point (Figure 9). Par exemple, le nuage de points exprimant majoritairement de la fluorescence FAM (bleu) correspond à des homozygotes pour l'un des deux allèles, le nuage rouge correspond à une fluorescence VIC majoritaire donc à des échantillons homozygotes pour l'autre allèle, tandis que le nuage vert correspond à une émission des deux fluorescences donc à des échantillons hétérozygotes pour le polymorphisme considéré. Les points noirs correspondent à une PCR qui n'a pas marché ou à un positionnement ambigu. Pour chaque mixe, le fournisseur précise à quel allèle, sauvage ou muté, est associé chacune des sondes VIC et FAM.

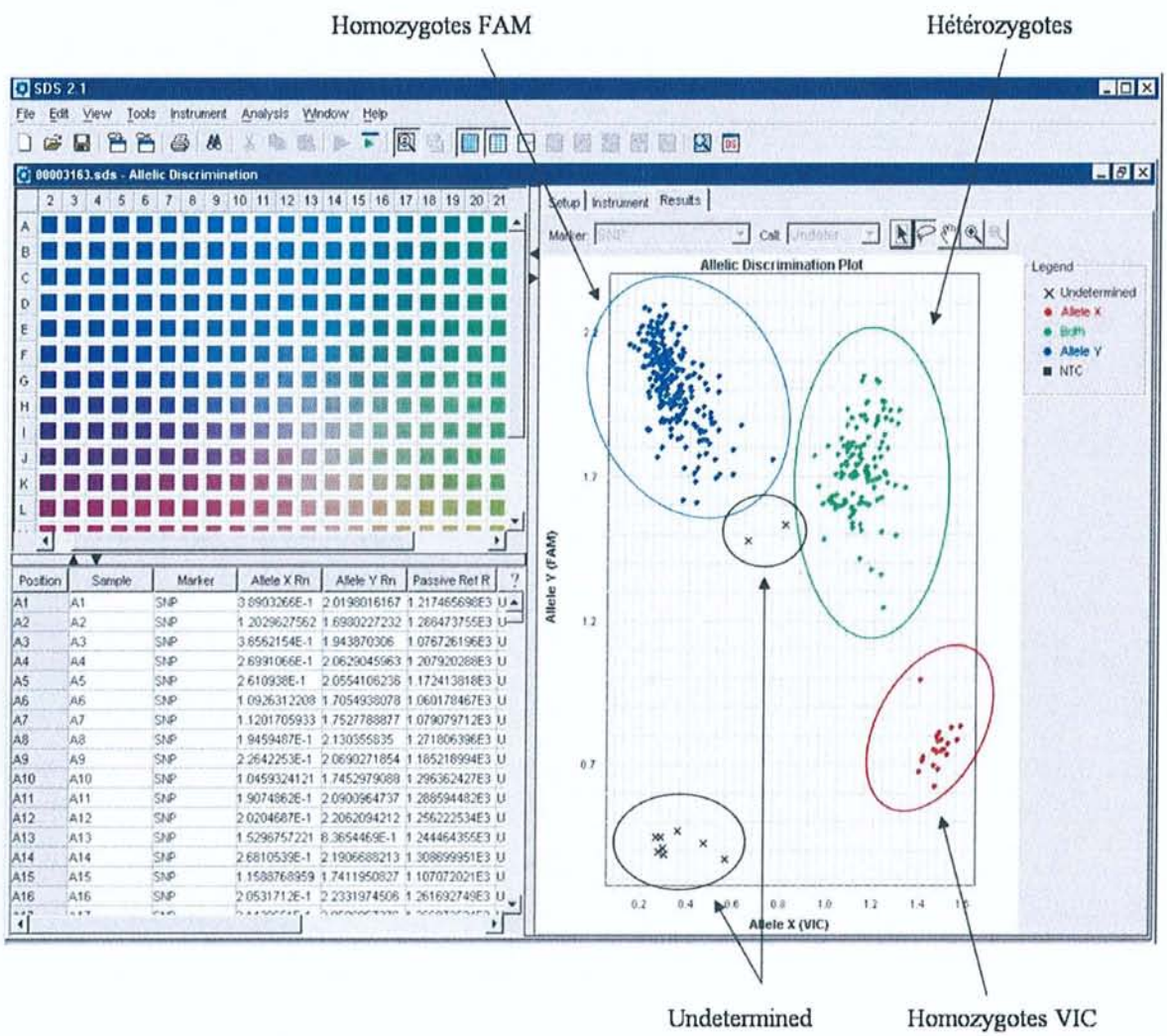


Figure 9 : Détermination des génotypes en fonction du type de fluorescence.

IV. RESULTATS

A. Rendements de l'extraction d'ADN

A partir de 5 à 10 millions de cellules nous avons obtenus des solutions d'ADN de concentration variable en fonction de la lignée (Tableau X), le meilleur rendement étant obtenu pour la lignée cellulaire Caco2. La pureté des solutions obtenues est correcte puisque le rapport des densités optiques (DO) est compris entre 1,8 et 2,1 (Tableau X).

Tableau X : Rendements de l'extraction d'ADN.

Lignée	**Quantité de cellules** ($x10^6$) (Vf = 500 µl)	**Concentration d'ADN** (ng/µL)	**Pureté** (DO_{260}/DO_{280})
Thp1	5	65	1.9
U937	5	37	1.9
HL60	10	156	1.8
HepG2	5	174	2.1
K562	10	313	1.9
Kyn2	5	503	2.0
Caco2	5	811	1.9

Vf : Volume final.

B. Résultats des génotypages

Les résultats obtenus pour la technique de génotypage par PCR Multiplex sont présentés figure 10. Ils représentent les résultats bruts, c'est à dire les photographies des bandelettes des trois Multiplex : IIA (Fig10A), IIB (Fig10B) et III (Fig10C). La codification sous la forme 0/1 est donnée en Annexe 3.

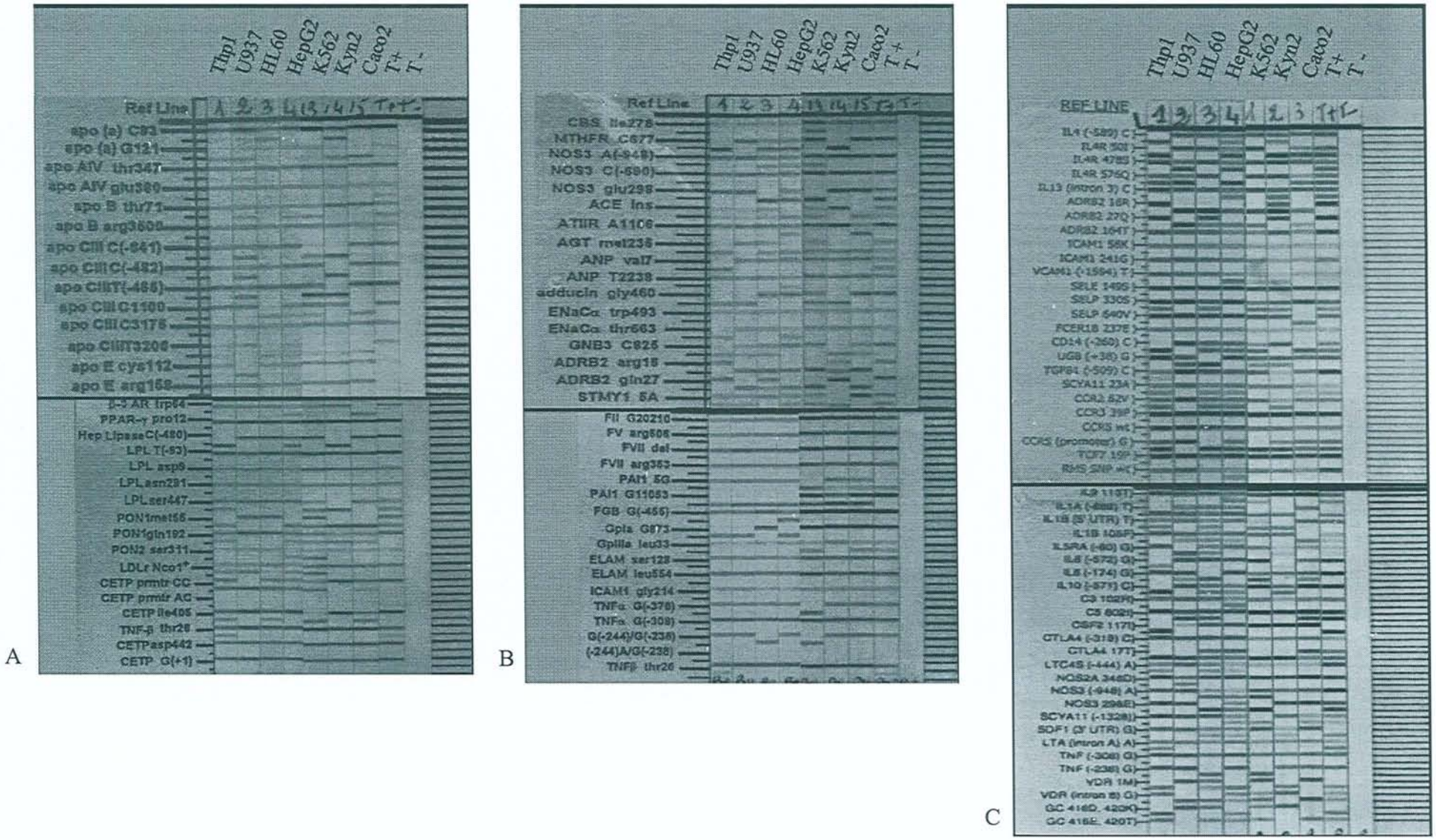


Figure 10 : Résultats du génotypage par les Multiplex IIA (A), IIB (B) et III (C) pour les 7 lignées étudiées.

Les résultats du génotypage des transporteurs ABC obtenus par PCR-RFLP et par les TaqMan *SNP genotyping assays*® sont présentés respectivement dans les tableaux XI et XII.
L'allèle sauvage est indiqué en majuscules tandis que l'allèle muté est en minuscule. Trois lettres correspondent à un acide aminé tandis qu'une seule lettre correspond à un nucléotide.

Tableau XI : Résultats du génotypage par PCR-RFLP.

	Thp1	**U937**	**HL60**	**K562**	**HepG2**	**Kyn2**	**Caco2**
ABCB1 T-129c	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
ABCB1 G1199a	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
ABCB1 C1236t	tt	tt	Ct	CC	CC	tt	Ct
ABCB1 G2677t/a	tt	tt	ta	GG	GG	GG	Gw*
ABCB1 C3435t	tt	tt	Ct	tt	CC	Ct	Ct

* w = t ou a

Tableau XII : Résultats du génotypage par la technique TaqMan.

	Thp1	**U937**	**HL60**	**K562**	**HepG2**	**Kyn2**	**Caco2**
ABCB1 ASP21asn	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/asn	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP
ABCB1 T-76a	TT	TT	Ta	aa	Ta	TT	Ta
ABCB1 G-1a	GG	GG	GG	aa	GG	GG	GG
ABCA1 ARG219lys	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/lys	ARG/ARG	ARG/ARG
ABCA1 ILE883met	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/met	ILE/ILE	ILE/ILE
ABCA1 LYS1587arg	Arg/arg	Arg/arg	Arg/arg	Arg/arg	Arg/arg	Arg/arg	Arg/arg
ABCA1 C-7t	CC	CC	Ct	tt	ND	CC	CC
ABCA1 G-395c	GG	Gc	Gc	cc	cc	GG	Gc
ABCA1 C-564t	ND	Ct	Ct	tt	tt	CC	Ct
ABCG8 THR400lys	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	lys/lys
ABCG8 TYR54cys	cys/cys	cys/cys	TYR/cys	cys/cys	TYR/cys	TYR/cys	TYR/TYR
ABCG8 ALA632val	ALA/ALA	ALA/ALA	ALA/ALA	ALA/ALA	ALA/val	ALA/ALA	ALA/ALA

ND Non déterminé

C. Synthèse des résultats

Pour ¾ des polymorphismes étudiés, il y a au minimum un allèle muté pour au moins une lignée sur sept. Chaque lignée présente des caractéristiques génétiques intéressantes en comparaison aux autres.

Par exemple, concernant le processus inflammatoire, la présence de l'allèle muté à la position C-571a de l'*IL10* ou à la position G-572c de l'*IL6* est associée à une augmentation du risque cardio-vasculaire [37, 38]. Or, la lignée Thp1 est homozygote pour l'allèle muté aux deux positions tandis que la lignée U937 est homozygote pour l'allèle sauvage aux deux positions. La lignée Thp1 est également la seule lignée à présenter un allèle muté pour les deux polymorphismes de la *LTA*, qui sont associés d'après la littérature à une augmentation du risque d'infarctus du myocarde [39]. D'autre part, les lignées K562 et HL60 sont homozygotes mutées pour le polymorphisme G-238a du *TNFA*, ce qui est associé à une susceptibilité augmentée de complications chez le sujet diabétique [40].

Si l'on considère les gènes de l'homéostasie des lipides, il est intéressant de noter que la lignée U937 est la seule exprimant l'isoforme E4/E4 de l'ApoE qui est associée à des taux plus élevés de LDLc et à une augmentation du risque de développer des maladies cardio-vasculaires [201]. De même, HepG2 est la seule lignée porteuse de l'allèle muté 219lys du transporteur de cholestérol *ABCA1* et la lignée intestinale Caco2 est double mutée pour le polymorphisme THR400 lys d'*ABCG8*, particulièrement exprimé dans l'intestin.

Concernant les gènes impliqués dans la régulation de la pression artérielle, la délétion de l'intron 16 de l'*ACE*, associée à une diminution de la concentration plasmatique de l'enzyme et à la susceptibilité à de nombreuses pathologies cardio-vasculaires [201], est présente chez toutes les lignées à l'exception de Kyn2.

Tandis qu'aucun autre facteur de coagulation n'est muté dans les lignées étudiées, le gène du fibrinogène présente l'allèle muté -455a pour la lignée hépatique HepG2 exclusivement. De plus, une seule lignée, K562, présente une mutation pour le polymorphisme du gène de la cystathionine béta synthase (*CBS*) impliquée dans le métabolisme de l'homocystéine.

Enfin, concernant les facteurs de transcription, aucune lignée n'est mutée pour les 3 polymorphismes de *PPARG* et de *TCF7*, mais Thp1, HL60, HepG2 et Kyn2 présentent au moins un allèle muté pour le polymorphisme MET1thr de *VDR* ; cette mutation étant associée à la susceptibilité au diabète de type I [41-43].

Pour faciliter la discussion ultérieure, nous avons groupé les résultats obtenus avec les différentes techniques en plusieurs tableaux, en fonction du processus biologique dans lequel sont impliqués les différents gènes étudiés :

- inflammation, adhésion cellulaire, facteur de croissance cellulaire et système immun (Tableau XIII),
- métabolisme des lipides et des lipoprotéines (Tableau XIV),
- régulation de la pression artérielle (Tableau XV),
- coagulation et pro-thrombose (Tableau XVI),
- autres (stress oxydant, et facteurs de transcription, Tableau XVII).

Les polymorphismes sont référencés par le numéro de référence des SNP (*rs number*) de la banque de données SNP du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Pour chaque polymorphisme, nous indiquons le génotype de chacune des lignées mais également l'effet supposé du polymorphisme d'après les données de la littérature. Nous avons mis en évidence par un code couleur les polymorphismes qui seraient d'après la littérature "protecteurs" contre le risque cardio-vasculaire (couleur verte) ou ceux qui seraient "délétères" (couleur rouge).

Tableau XIII : Génotypes des lignées pour une sélection de polymorphismes de gènes de l'inflammation, de l'adhésion cellulaire, de facteur de croissance cellulaire et du système immun.

Gene	SNP	SNP ID	Location	Disorder associated with the mutated allele	Freq [1]	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
INFLAMMATION												
CCR2	VAL62ile	rs1799864	Val64Ile, G46295a, exon 2	Effects on HDL concentration [44]. Reduced atherosclerosis susceptibility [45] & risk for severe coronary artery disease (CAD) [46]	0,13 [2]	VAL/ile	VAL/VAL	VAL/ile	VAL/VAL	VAL/ile	VAL/ile	VAL/VAL
CCR3	PRO39leu	rs5742906	C320t	No data	0	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO
CCR5	WT/del32 (wt/Δ580-611)	rs333	exon 3	Lack of CCR5 expression. Protective effect against atherosclerosis initiation [45, 47] & reduced risk for severe CAD [46]	0,048 [3]	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT	WT/WT
CCR5	G-2454A	rs1799987	G59029a, promoter	No data	0.435 [3]	G/a	G/G	a/a	a/a	G/a	G/a	G/a
CSF2	ILE117thr	rs25882	T2600c	No data	0.192	thr/thr	nd	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE
IL10	C-571a	rs1800872	C-592a or C8700a	Associated with low IL-10 production rates. Significant association between haplotype containing this mutated allele and risk of coronary events [37]	0,202	a/a	C/C	C/a	C/C	C/a	C/a	C/C
IL13	C4045t	rs1295686	C1923t, intron 3	No data	0,233	C/C	C/C	C/C	C/C	C/t	C/t	C/C
IL1A	C-889t	rs1800587	C549t, 5' UTR	Associated with increase promoter activity [10]	0,308	C/C	C/t	C/t	C/C	C/t	C/C	t/t
IL1B	Phe105Phe	rs1143634	C4336t or C3954t	No data	0,223	C/C	C/t	C/t	C/C	C/t	C/C	t/t
IL4	C-589t	rs2243250	C582t or C-590t, 5' near gene	Predictor of thromboembolic stroke [48]	0,164	t/t	C/C	C/C	C/C	C/t	C/t	C/C
IL4R	SER478pro	rs1805015	SER503pro, T1682c	Higher risk for large vessel stroke in children with sickle cell anemia [49]	0,167	SER/SER	SER/pro	SER/SER	SER/SER	SER/pro	SER/SER	SER/SER
IL4R	Gln576arg	rs1801275	A1902g	Susceptibility to allergic inflammatory disorders [50, 51]	0,225	GLN/arg	GLN/arg	GLN/GLN	GLN/GLN	arg/arg	GLN/GLN	GLN/arg
IL4R	ILE50val	rs1805010	ILE75val, A398g	Decreased susceptibility to myocardial infarction (MI) in smokers [52]	0,44	val/val	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/val	val/val	ILE/val
IL5RA	G-80a	rs2290608	G482a, 5' UTR	Susceptibily to multiple sclerosis [53]	0.308	G/G	a/a	G/a	G/G	G/G	G/a	G/G
IL6	G-572c	rs1800796	G589c, 5' near gene	Associated with higher systolic blood pressure [38]	0,043	c/c	G/G	G/G	G/G	G/G	c/c	G/G
IL6	G-174c	rs1800795	G987c, 5' near gene	G allele: Higher IL6 level; susceptibility to diabetes mellitus insulin-dependent, associated with stroke history, insulin resistance and dyslipidemia [54, 55]	0.533	G/G	ND	c/c	G/c	G/G	G/G	G/c
IL9	THR113met	rs2069885	C4244t	No data	0,108	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/met	THR/met	THR/THR	THR/THR

Gene	SNP	SNP ID	Location	Disorder associated with the mutated allele	Freq [1]	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
LTA	A252g	rs909253	A1069g, intron 1	Affected transcription of LTA. Increased risk for MI [39]	0,358	A/g	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
LTA	THR26asn	rs1041981	THR60asn, C804a, exon 3	Associated with increased risk for MI and with CAD [39]	0,358	THR/asn	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR
SCYA11	ALA23thr	rs3744508	C/t	Significantly associated with risk of MI [56]	0,175	ALA/thr	ALA/ALA	ALA/thr	ALA/ALA	ALA/thr	ALA/ALA	ALA/thr
SCYA11	G-1328a	rs4795895	G1169a, 5' near gene	No data	0,158	G/G	G/G	G/G	a/a	G/a	G/G	G/a
SDF1	G+800A	rs1801157	G880a or G-801a, 3' UTR	Lower SDF1 plasma concentrations. Lower susceptibility to atherosclerosis	0,175	G/G	G/G	G/a	G/G	G/a	G/a	G/G
TNFA	G-308a	rs1800629	5' near gene	Seems to be a predisposing factor for development of CAD in particular pathological settings associated with the disease itself, such as diabetes [57]	0,217	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
TNFA	G-376a	rs1800750	5' near gene	Susceptibility to multiple sclerosis and to cerebral malaria [58]	0,008	G/G	G/G	G/G	a/a	G/G	G/G	G/G
TNFA *	G-244a & G-238a	rs673/ rs361525	5' near gene	Type 2 diabetic patients carrying 238aa genotype might be more susceptible to diabetic complications such as atherosclerosis [40]	0 & 0,068 [2]	G/G & G/G	G/G & G/G	G/G & a/a	G/G & a/a	G/G & G/G	G/G & G/G	G/G & G/G
UGB	G+38a	rs3741240	G587a, 5' UTR	Lower plasma UGB levels	0,367	G/G	G/a	a/a	G/a	G/G	G/a	G/G
CELLULAR ADHESION												
ICAM1	LYS56met	rs5491	A120t, exon 2	No data	0	LYS/LYS	LYS/LYS	LYS/LYS	LYS/LYS	LYS/LYS	LYS/LYS	LYS/LYS
ICAM1	GLY241arg	rs1799969	G721a, exon 4	Associated with lower sICAM-1 levels [59] and lower risk of type 1 diabetes [60]. Also association with venous thrombosis events [61]	0,15	GLY/GLY	GLY/GLY	GLY/GLY	GLY/GLY	GLY/GLY	GLY/GLY	GLY/GLY
MMP3	A_5-1171A_6	rs3025058	promoter	Lower stromelysin levels in arterial walls. Associated with increased risk of atherosclerosis and MI and hypertension (HTA) [62]	0,333 [2]	5A/A6	5A/A6	5A/5A	5A/A6	5A/A6	A6/A6	5A/5A
SELE	SER128arg	rs5361	SER149arg, A561c	Elevation of atherosclerosis risk. Associated with stroke history [54]	0.092	SER/SER	SER/SER	SER/SER	SER/SER	SER/SER	SER/SER	SER/SER
SELE	LEU554phe	rs5355	C/t	Higher risk for early severe atherosclerosis [63-65]	0.025	LEU/LEU	LEU/LEU	LEU/LEU	LEU/LEU	LEU/LEU	LEU/LEU	LEU/LEU
SELP	SER330asn	rs6131	SER290asn, G40a	Predictor of CHD in whites [66]	0,2	SER/asn	SER/SER	SER/asn	SER/asn	SER/SER	SER/asn	SER/SER
SELP	VAL640leu	rs6133	VAL599leu, G75271t	Predictor of thromboembolic stroke [48]	0,117	VAL/VAL	VAL/VAL	VAL/VAL	VAL/VAL	VAL/VAL	VAL/VAL	leu/leu

Gene	SNP	SNP ID	Location	Disorder associated with the mutated allele	Freq [1]	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
VCAM1	T-1594c	rs1041163	T-1592C, or T707c, 5' near gene	No data	0,075	T/T	T/T	T/T	T/c	T/c	T/c	T/T
GROWTH FACTORS												
TGFB1	C-509t	rs1800469	C629t, 3' near gene	Increased plasma levels of TGFβ1 [67]. Increased risk of stroke [68]	0,31	C/t	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
IMMUNE SYSTEM												
C3	ARG102gly	rs2230199	C364g	Maybe associated with increased risk of developing MI in coronary heart disease (CHD) patients [69]	0,175	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/gly	ARG/ARG	ARG/ARG
C5	VAL802ile	rs17611	G2416a	No data	0.367	ile/ile	VAL/ile	VAL/ile	ile/ile	ile/ile	ile/ile	VAL/ile
CD14	C-260t	rs2569190	C2232t, promoter region	May worsen atherosclerosis & associated with increased risk for non-lethal cardiovascular events [70-72]	0.474	t/t	C/C	C/t	C/t	C/t	C/C	t/t
CTLA4	C-318t	rs5742909	C875t, 5' near gene	Regulation of the expression of CTLA4 [73]	0.092	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
CTLA4	THR17ala	rs231775	A49g or A1241g, exon 1	Increased susceptibility to type I diabetes and to hypertension [74]	0,379	ala/ala	ala/ala	THR/ala	ala/ala	THR/ala	ala/ala	THR/ala
FCER1B	GLU237gly	rs569108	exon 7	No significant data	0.042	GLU/GLU	GLU/GLU	GLU/GLU	GLU/GLU	GLU/GLU	GLU/GLU	GLU/GLU

CAD: coronary artery disease, CVD: Cardiovascular disease, HTA: Hypertension, MI: myocardial infarction

* haplotype

[1] mutated allele frequencies in Caucasians (HapMap except if indicated)

[2] PGA-EUROPEAN-PANEL

[3] CAUC 1

[4] PARC-ROCHESTER-PANEL

[5] American Caucasians

[6] PARC-EUROPEAN-PANEL

[7] PGA_CEPH-PANEL

[8] PGA-EUROPEAN-PANEL

Tableau XIV : Génotypes des lignées pour une sélection de polymorphismes de gènes du métabolisme des lipides et des lipoprotéines.

Gene	SNP	SNP ID	Location	Disorder associated with the mutated allele	Freq [1]	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
ABCA1	ARG219lys	rs2230806	G1051a, exon 7	Significantly more frequent in familial hypercholesterolemia (FH) patients without premature CHD than those with premature CHD. Associated with slightly higher HDL and lower prevalence of CAD [75]	0,158	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/lys	ARG/ARG	ARG/ARG
ABCA1	ILE883met	rs4149313	A/g, exon 18	Associated with higher HDL levels [76]	0,133	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/met	ILE/ILE	ILE/ILE
ABCA1	LYS1587arg	rs2230808	A/g, exon 35	LYS: Associated with decreased ApoA1 levels [77]	0,842	arg/arg	arg/arg	arg/arg	arg/arg	arg/arg	arg/arg	arg/arg
ABCA1	C-7t	rs1800977	C-14t, 5' near gene	No significant data	0.358	CC	CC	Ct	tt	Undetermined	CC	CC
ABCA1	G-395c	rs2246293	5' near gene	No significant data	no data	GG	Gc	Gc	cc	cc	GG	Gc
ABCA1	C-564t	rs2422493	C−565t or C−477t, 5' near gene	Effect not clear: associated with increase risk for sub clinical cardiovascular disease [75] but also with lower risk of CHD [76]	no data	nd	Ct	Ct	tt	tt	CC	Ct
ABCG8	THR400lys	rs4148217	C1199a	Lower decrease in total cholesterol and LDLc in male under dietary changes [78]	0,254	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	lys/lys
ABCG8	TYR54cys	rs4148211	A161g	Lower decrease in total cholesterol and LDL in female under dietary change [78]	0,375	TYR/TYR	TYR/TYR	TYR/cys	TYR/TYR	TYR/cys	TYR/cys	cys/cys
ABCG8	ALA632val	rs6544718	C1895t	Associated with different plasma total cholesterol, LDL complex and ApoB in low-cholesterol consumers [79]	0,208	ALA/ALA	ALA/ALA	ALA/ALA	ALA/ALA	ALA/val	ALA/ALA	ALA/ALA
ABCB1	T-129c	rs3213619	exon 1b	Associated with ABCB1 expression in placenta [36]	0,051	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
ABCB1	G-1A	rs2214102	5'UTR	No significant data [80]	0,133	GG	GG	GG	aa	GG	GG	GG
ABCB1	ASN21asp	rs9282564	A61G, exon 2	No significant data [80]	0,1	AA	AA	AG	AA	AA	AA	AA
ABCB1	G1199a	rs2229109	SER400asn, exon 11	Alteration of ABCB1 activity in vitro [81]	0,033	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
ABCB1	C1236t	rs1128503	exon 12	Modifier of drugs pharmacokinetics [82, 83]	0,392	tt	tt	Ct	CC	CC	tt	Ct
ABCB1	T-76A	rs1922242	intron 16	No significant data [80]	0,433	TT	TT	Ta	aa	Ta	TT	Ta
ABCB1	G2677w (t/a)	rs2032582	ALA892ser/thr, exon 21	Modifier of drugs pharmacokinetics [84]	0.398	tt	tt	ta	GG	GG	GG	Gw
ABCB1	C3435t	rs1045642	exon 26	Modifier of drugs pharmacokinetics [84]	0.543	tt	tt	Ct	tt	CC	Ct	Ct
APOAIV	THR347ser	rs675	A/t	Associated with lower TG and with lower ApoB, LDLC and total cholesterol	0,2	THR/THR	THR/ser	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR
APOAIV	GLN360his	rs5110	G/t	Higher HDL plasma level	0.058	GLN/GLN	GLN/GLN	GLN/GLN	GLN/GLN	GLN/GLN	GLN/GLN	GLN/GLN
APOB	THR71ile	rs1367117	C/t	Associated with higher LDL, ApoB and TC [2] but also with lower blood pressure [74]	0.267	THR/THR	THR/ile	THR/THR	THR/ile	THR/ile	THR/THR	THR/THR

Gene	SNP	SNP ID	Location	Disorder associated with the mutated allele	Freq [1]	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
APOB	ARG3500gln	rs5742904	G/a	Reduces affinity for receptors. Hypercholesterolemia	0	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG
APOCIII	C-641a	rs2542052	5' near gene	No significant data	no data	C/C	C/a	C/C	C/a	C/C	a/a	C/C
APOCIII	C-482t	rs2854117	5' near gene	Higher TG levels. Higher susceptibility to CAD [85]	0.292 [4]	C/C	C/t	C/C	C/C	C/C	t/t	C/C
APOCIII	T-455c	rs2854116	5' near gene	Higher ApoC3 and TG levels. Higher susceptibility to CAD [85]	0.375 [4]	T/T	T/c	T/T	T/c	T/T	c/c	T/T
APOCIII	C1100t	rs4520	exon 3	Higher LDL, ApoB, TC and TG [2]	0.391 [4]	C/C	C/C	t/t	C/t	C/t	C/C	t/t
APOCIII	C3175g	rs5128	SsstI or C3238g, 3' UTR	Higher TG and ApoC3 levels [86]	0.062 [4]	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
APOCIII	T3206g	rs4225	3' UTR	Higher TG levels [87]	0.438 [4]	T/g	T/T	g/g	g/g	T/g	g/g	g/g
APOE *	CYS112arg & ARG158cys	rs429358/ rs7412	CYS112 & ARG158 = ε3, CYS112 & 158cys = ε2 and 112arg & ARG158 = ε4	ε2: increased risk to develop familial type III hyperlipoproteinemia & ε4: susceptibility to alzheimer disease and to CAD	0.149 & 0,087 [5]	ε3/ε3	ε4/ε4	ε3/ε3	ε3/ε3	ε3/ε3	ε3/ε3	ε3/ε3
CETP	ILE405val	rs5882	A/g	Decreased CETP concentrations and activity and increased HDL concentrations [88]	0,305	ILE/val	ILE/ILE	ILE/val	val/val	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/val
CETP	ASP442gly	rs2303790	A/g	Decreased plasma CETP mass and activity; increased HDL concentrations	0	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP
CETP *	C-631a & C-629a	rs1800776/rs1800775	5' near gene	-629a associated with lower CETP and maybe with higher HDLc [89]	0,022 & 0,425 [4]	CC/Ca	CC/aa	CC/Ca	CC/Ca	CC/Ca	CC/CC	CC/Ca
CETP	G(+1)a	rs5742907	intron 14	CETP deficiency; increased and enlarged HDL	0	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
LDLR	*Nco*I +/-	rs5742911	A/g, exon 18	Associated with small-vessel stroke risk in sickle cell anemia [7]	G: 0.318 [6]	NcoI+/-	NcoI+/-	NcoI+/+	NcoI+/-	NcoI+/-	NcoI+/+	NcoI+/+
LIPC	C-480t	rs1800588	5' near gene	Higher HDLc [90]. Higher susceptibility to CHD	0.258	t/t	C/C	C/C	C/C	C/t	t/t	C/C
LPL	T-93g	rs1800590	5' near gene	Familial combined hyperlipidemia with decreased HDL and increased TG levels	0.017	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T
LPL	ASP9asn	rs1801177	G/a	Familial combined hyperlipidemia with decreased HDL and increased TG levels. Higher diastolic blood pressure	no data	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP	ASP/ASP
LPL	ASN291ser	rs268	A/g	Familial combined hyperlipidemia with decreased HDL and increased TG levels	0.008	ASN/ASN	ASN/ASN	ASN/ASN	ASN/ASN	ASN/ASN	ASN/ASN	ASN/ASN
LPL	SER447ter	rs328	C/g, exon 6	Lower LPL activity and to hyperlipidemia but also associated with lower blood pressure [74]	0.125	SER/ter	SER/SER	SER/SER	SER/ter	SER/SER	ter/ter	SER/SER
LPA	C93t	rs1652503	5' UTR	Lower LPA concentrations. Lower susceptibility to atherosclerotic disease	no data	C/C	C/C	C/t	C/C	C/C	C/t	C/C

Tableau XV : Génotypes des lignées pour une sélection de polymorphismes de gènes impliqués dans la régulation de la pression artérielle.

Gene	SNP	SNP ID	Location	Disorder associated with the mutated allele	Freq [1]	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
Renin-Angiotensin system												
ACE	Alu element INS/del	rs1799752	intron 16	Elevated ACE plasma level. Variation of ACE inhibitors efficacy & susceptibility to CVD	0.42 [91]	I/d	I/d	I/d	I/d	d/d	I/I	d/d
AGT	MET235thr	rs699	T/c	Effect on AGT plasma concentration & elevation susceptibility to CVD and HTA	0.383	thr/thr	MET/MET	MET/thr	MET/thr	thr/thr	thr/thr	thr/thr
AGTR1	A1166c	rs5186	3'UTR	Susceptibility to CVD and HTA	0,348 [6]	A/A	A/A	A/A	A/A	A/c	A/A	A/c
Adrenergic-cholinergic receptors												
ADRB2	GLY16arg	rs1042713	G1633a	GLY: associated with metabolic syndrome in men	0,325	arg/arg	GLY/GLY	GLY/GLY	GLY/GLY	GLY/GLY	GLY/arg	GLY/GLY
ADRB2	GLU27gln	rs1042714	G1666c	GLU: associated with obesity and with metabolic syndrome in men; risk factor for CAD [92]	0,533	gln/gln	GLU/GLU	GLU/gln	GLU/GLU	GLU/GLU	gln/gln	GLU/GLU
ADRB2	THR164ile	rs1800888	C2078t	Would represent a risk factor for elevated blood pressure in women [93]. However, no effects on CVD risk in other studies [92, 94, 95]	0,008	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR	THR/THR
ADRB3	ARG64trp	rs4994	C/t	ARG: would increases the capacity to gain weight	0,870 [7]	trp/trp	trp/trp	trp/trp	trp/trp	ARG/trp	trp/trp	ARG/ARG
GNB3	C825t	rs5443	C/t	Susceptibility to hypertension and to higher BMI	0.388	t/t	C/t	C/t	C/C	C/C	t/t	C/t
Sodic system												
ADD1	GLY460trp	rs4961	G/t	Enhances tubular sodium reabsorption. Combination with ACE DD homozygosity worsened cardiovascular prognosis	0.208	trp/trp	trp/trp	GLY/GLY	GLY/trp	GLY/GLY	trp/trp	GLY/GLY
SCNN1A	TRP493arg	rs5742912	T/c, exon 10	May be associated with higher risk of ischemic stroke [96]	0.042	TRP/TRP	TRP/TRP	TRP/TRP	TRP/TRP	TRP/TRP	TRP/TRP	TRP/TRP
SCNN1A	ALA663thr	rs2228576	G/a, exon 13	Would be associated with lower risk of HTA [96]	0,258	ALA/ALA	thr/thr	thr/thr	thr/thr	thr/ALA	thr/thr	thr/thr
Arachidonic acid metabolism												
LTC4S	A-444c	rs730012	A620c, 5' near gene	Associated with large vessel stroke risk in children with sickle cell anemia [49]	0.325	A/c	A/A	A/c	A/A	A/c	A/A	A/A

Gene	SNP	SNP ID	Location	Disorder associated with the mutated allele	Freq [1]	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
Vasodilatation												
NOS2A	C231t	rs1137933	exon 10	Higher susceptibility to multiple sclerosis [97]	0.200	C/C	C/t	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
NOS3	A-948g	rs1800779	A-922g	A: higher susceptibility to ischemic stroke [98]	0,388	A/A	A/A	A/g	A/g	A/g	A/A	A/A
NOS3	C-690t	rs3918226	intron	No data	0,205 [7]	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
NOS3	GLU298asp	rs1799983	G894t, exon 7	Decrease NOS activity. Associated with susceptibility to coronary spasms, hypertension, ischemic heart disease and stroke risk [99]	0,342	GLU/GLU	GLU/GLU	asp/asp	asp/asp	GLU/asp	GLU/GLU	GLU/GLU
NPPA	VAL7met	rs5063	G664a	Lower levels of ApoA1 and HDL in FH patients [100]. Association with CAD? (inconsistent results)	0.058	met/met	VAL/VAL	VAL/VAL	VAL/VAL	VAL/VAL	VAL/VAL	VAL/VAL
NPPA	T2238c	rs5065	ARG152ter	Associated with CAD (myocardial infarction, stroke, atherosclerosis…) [100]	0.150	T/T	T/T	T/T	T/T	T/c	T/T	T/T

Tableau XVI : Génotypes des lignées pour une sélection de polymorphismes de gènes impliqués dans la coagulation et la pro-thrombose.

Gene	SNP	SNP ID	Location	Disorder associated with the mutated allele	Freq 1	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
THROMBOSIS												
FII	G20210a	rs1799963	3' UTR	Elevated plasma prothrombin levels. Increased risk of venous thrombosis and ischemic stroke	no data	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
FV	ARG506gln	rs6025	G1691a, or Leiden mutation	Factor V deficiency. Susceptibility to thrombo-embolic events	0,008	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG
FVII	(-)323 10bp del / ins	rs5742910	5' near gene	Associated with a reduction in the risk of MI	0.087 [8]	del/del	del/del	del/del	del/del	del/del	del/del	del/del
FVII	ARG353gln	rs6046	G/a	Reduction of activated factor VII activity & decreased risk of MI	0,117	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG	ARG/ARG
FGB	G-455a	rs1800790	5' near gene	Increase in plasma fibrinogen. Associated with higher whole blood viscosity [101], may also be associated with cardiovascular risk [102]	0.255	G/G	G/G	G/G	G/G	G/a	G/G	G/G
GP1a	G873a	rs1062535		Associated with GP Ia/IIa surface expression & maybe with stroke risk [99]	0,358	a/a	a/a	G/G	G/G	a/a	G/G	G/G
GPIIIa	LEU33pro	rs5918	T1565c	Frequently implicated in syndromes of immune-mediated platelet destruction. Susceptibility to CVD such as CAD	0.148	LEU/LEU	LEU/LEU	LEU/LEU	LEU/pro	LEU/LEU	LEU/LEU	LEU/pro
PAI1	G_5-675G_4		5' near gene	Increased PAI1 plasma level. Modest increased in MI risk [103]	0,543 [8]	G5/G5	G5/G5	G5/G5	G4/G4	G5/G5	nd	G5/G4
PAI1	G11053t	rs7242	3' UTR	G: associated with higher MI risk and would affect BMI and plasma insulin levels [104]	0,517	t/t	t/t	t/t	G/t	t/t	G/t	G/t
HOMOCYSTEIN METABOLISM												
CBS	ILE278thr	rs5742905	T833c, exon 8	Homocysteinuria, Hyperhomocysteinemia	0	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/thr	ILE/ILE	ILE/ILE	ILE/ILE
MTHFR	C677t	rs1801133	Val/Ala, exon 5	Reduced enzyme activity. Risk factor for vascular disease and maybe CAD	0.242	t/t	C/C	C/t	C/C	C/t	t/t	C/C

Tableau XVII : Génotypes des lignées pour une sélection de polymorphismes de gènes impliqués dans le stress oxydant et codant des facteurs de transcription.

Gene	SNP	SNP ID	Location	Disorder associated with the mutated allele	Freq 1	Thp1	U937	HL60	K562	HepG2	Kyn2	Caco2
OXYDATIVE STRESS												
PON1	MET55leu	rs854560	A/t	Higher PON1 plasma concentration and activities. Independent risk factor for CVD	0,397	leu/leu	MET/MET	MET/MET	MET/leu	leu/leu	leu/leu	leu/leu
PON1	GLN192arg	rs662	A/g	Higher PON1 activity. Susceptibility to CAD and to coronary artery spasm	0,358	GLN/arg	GLN/GLN	GLN/GLN	GLN/arg	GLN/arg	nd	GLN/arg
PON2	SER311cys	rs7493	C/g	Protective against CAD or not? contradictory results	0,242	SER/SER	SER/SER	SER/SER	SER/cys	SER/cys	SER/SER	SER/SER
TRANSCRIPTION FACTORS												
PPARG	PRO12ala	rs1801282	C/g	PRO: higher susceptibility to diabetes mellitus type II, obesity	0,075	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO
TCF7	PRO19thr	No data	C883a, exon 2	May represent a risk factor for type 1 diabetes [105]	0,12 [105]	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO	PRO/PRO
VDR	MET1thr	rs2228570	FokI f/F, T12022c exon 2	F allele: increases transcriptional activity of VDR [106]. Associated with type I diabetes susceptibility [41-43]	0,442	F/F	f/f	f/F	f/f	F/F	F/F	f/f
OTHERS												
GC *	ASP416glu & THR420lys	rs7041/ rs4588	exon 11	Associated with higher susceptibility to type I diabetes [107]	0.575 & 0,234 [3]	ASP416/ 416glu & THR420/ THR420	ASP416/ ASP416 & 420lys/ 420lys	ASP416/ 416glu & THR420/ 420lys	ASP416/ 416glu & THR420/ 420lys	ASP416/ 416glu & THR420/ THR420	ASP416/ ASP416 & 420lys/ 420lys	416glu/ 416glu & THR420/ THR420

V. DISCUSSION

Nous reportons ici pour la première fois, à notre connaissance, le profil génétique des lignées Thp1, U937, HL60, K562, HepG2, Kyn2 et Caco2 pour 120 polymorphismes de 68 gènes codants des protéines connues pour initier et/ou favoriser le développement des maladies cardio-vasculaires ou pour modifier la réponse au traitement pharmacologique de ces maladies. Ces lignées présentent de nombreuses mutations alléliques. En effet, sur l'ensemble des 120 polymorphismes étudiés, seuls ¼ environ sont présents à l'état homozygote sauvage dans les 7 lignées cellulaires. La présence de ces nombreux polymorphismes suggère que pour chaque lignée, certains processus biologiques pourraient être affectés. Nous avons mis en évidence par un code couleur les polymorphismes qui seraient d'après la littérature "protecteurs" contre le risque cardio-vasculaire (couleur verte) ou ceux qui seraient "délétères" (couleur rouge) (tableaux XIII à XVII).

Les profils génétiques établis forment une base de données utile lors du choix d'un modèle cellulaire et lors de l'interprétation des résultats obtenus avec ces modèles. De plus, les différences de répartition des caractéristiques génétiques entre lignées pourraient permettre d'affiner les études de physiopathologie et de pharmacotoxicologie qui peuvent être conduites sur ces modèles *in vitro*. De nombreux polymorphismes sont connus pour influencer l'homéostasie des lipides [108, 109] ou la réponse aux traitements hypolipémiants [110-112]. Nous avons choisi de détailler ici l'intérêt de la connaissance des profils génétiques de ces lignées à travers l'exemple du métabolisme des lipides et des médicaments hypolipémiants.

Si l'on considère leurs applications en physiopathologie, les lignées cellulaires continues sont utilisées pour étudier par exemple des voies de régulation, des voies de signalisation, la localisation de protéines ou encore la modulation de la production de phénotypes d'intérêt. Par exemple, les lignées monocytaires Thp1 et U937 sont utilisées après différenciation en macrophages ou en cellules spumeuses pour étudier les mécanismes macrophagiques de l'athérosclérose. Or, nous avons montré que ces lignées sont porteuses de nombreuses mutations de gènes associés au métabolisme des lipides. Les profils génétiques des lignées cellulaires modèles devraient donc être pris en compte au moment de l'interprétation des résultats de ce type d'étude.

Certains polymorphismes de *CETP* sont associés à une diminution de l'activité de la protéine et à une augmentation du HDLc [88, 89, 201]. Tandis que la lignée Kyn2 est homozygote

sauvage pour tous les polymorphismes de *CETP* que nous avons étudié, les autres lignées sont porteuses d'au moins un allèle muté. La mutation de la *LPL* en position 447 diminuerait l'activité de la protéine et a été associé à une hyperlipidémie [74]. Les lignées Thp1, K562 et Kyn2 portent au moins un allèle muté tandis que les autres lignées sont homozygotes pour l'allèle sauvage. Ces différences entre lignées permettent ainsi de disposer de plusieurs modèles pour étudier les effets et la modulation de ces différents gènes.

D'autre part, la connaissance des profils génétiques de ces lignées pourraient servir à étudier l'effet d'une mutation. Par exemple, il n'est pas clairement défini si le polymorphisme THR346ser de l'*APOAIV* serait plutôt protecteur ou défavorable [85]. La lignée macrophagique U937 est la seule porteuse de l'allèle muté et pourrait donc être utilisée comme modèle d'étude de ce polymorphisme. De même, l'effet du polymorphisme C-564t du transporteur *ABCA1* n'est pas clairement déterminé [75, 76]. La lignée hépatique Kyn2 est homozygote pour l'allèle sauvage tandis que la lignée HepG2 est double mutée à cette position. Les deux lignées pourraient donc servir de modèles d'étude de ce polymorphisme.

Ces lignées permettraient également de rechercher de nouvelles cibles pharmacologiques. Par exemple, les transporteurs ABCA1 et ABCG8 sont respectivement responsables du transport inverse du cholestérol des cellules périphériques vers le foie et de la limitation de l'absorption des stérols au niveau intestinal [201]. Ces deux transporteurs sont considérés comme des cibles potentielles de traitements à visée hypolipémiante. HepG2 est la seule lignée porteuse de l'allèle muté 219lys d'*ABCA1* qui est associé à un risque moindre de complication coronarienne [75]. L'allèle muté du polymorphisme THR400lys du gène codant le transporteur ABCG8 (qui est particulièrement exprimé dans l'intestin) est associé à une moins bonne réponse au traitement diététique à visée hypolipémiante [78]. Tandis que les autres lignées sont homozygotes pour ce polymorphisme, la lignée intestinale Caco2 est double mutée est pourrait être un modèle pour étudier cette cible thérapeutique potentielle.

De plus, ces transporteurs sont impliqués, en parallèle avec les enzymes du métabolisme du médicament, dans la pharmacocinétique des médicaments hypolipémiants. Ainsi, l'allèle muté pour le polymorphisme C1236T d'*ABCB1* a été associé à une meilleure réponse au traitement par simvastatine (diminution plus importante du cholestérol total et du cholestérol LDL) [113]. Tandis que la lignée hépatique Kyn2 est double mutée à cette position, la lignée HepG2 est homozygote pour l'allèle sauvage. Le génotype des lignées utilisées pour ce type d'étude devrait donc être considéré au moment de l'interprétation des résultats.

Enfin, la lignée U937 est la seule lignée à présenter l'isoforme E4/E4 de l'ApoE qui est associée à des taux plus élevés de LDLc et à une augmentation du risque de développer des

maladies cardio-vasculaires et la maladie d'Alzheimer [201]. De plus, l'allèle ε4 est associé à une moins bonne réponse au traitement par statines [114]. Cette lignée pourrait ainsi être utilisée afin d'étudier cette caractéristique génétique mais aussi comme source de production de l'isoforme E4 de la protéine.

Il existe peu de travaux présentant le génotype de l'une ou l'autre des lignées pour un ou plusieurs des polymorphismes étudiés. A notre connaissance, seuls Brandon et collaborateurs [18], ont décrit le profil de 4 lignées cellulaires, dont HepG2 et Caco2, pour 34 polymorphismes de 11 CYP450, 37 polymorphismes de 10 enzymes de la phase II du métabolisme des médicaments et 17 polymorphismes de 3 transporteurs ABC. Leur but était de valider ces modèles cellulaires utilisés dans les études de métabolisme et de transport des médicaments. De plus, ces enzymes ont également des substrats physiologiques importants pour le système cardio-vasculaire tels que des leucotriènes ou des lipides. Il est à noter que nous avons en commun avec cette étude d'avoir réaliser le génotypage de HepG2 et Caco2 pour 3 polymorphismes d'*ABCB1*. Cependant, si nos résultats concordent pour la lignée HepG2 (c'est à dire homozygote pour l'allèle sauvage en position C1236T, G2677T/A et C3435T), ils diffèrent pour Caco2. En effet, ces auteurs observent que Caco2 est double mutée en position C3435T mais homozygote pour l'allèle sauvage en position C1236T et G2677T/A, tandis que nous observons que Caco2 est hétérozygote pour les trois polymorphismes. Nous ne pouvons expliquer cette différence puisque nous avons confirmé ces résultats par une nouvelle extraction d'ADN et un nouveau génotypage.

Chacune des techniques que nous avons utilisées présente des avantages et des inconvénients. Le système de PCR-détection Multiplex a permis dans des études précédentes de mettre en évidence plusieurs gènes candidats de pathologies cardio-vasculaires [2, 7-10]. Cette technique est rapide, simple et peut-être appliquée à d'autres pathologies (asthme, troubles bipolaires, ...) avec ajout possible de nouveaux marqueurs potentiels au fur et à mesure de l'évolution scientifique. De plus, au vu du nombre élevé de génotypes obtenus, cette technique peut être utilisée pour guider le développement d'algorithmes incluant les contributions génétiques au calcul de scores agrégés de risque et donne les bases au développement de panels à étudier pour le diagnostic et le pronostic en pratique clinique. La technique de détection par PCR-RFLP est une technique simple et peu couteuse mais qui demande beaucoup de temps pour faire des analyses multiples. Enfin, la technique de PCR en temps réel intégrant le système TaqMan est très rapide à mettre en place et permet le

traitement d'un nombre important d'échantillons. Cependant, son coût est élevé, et elle ne permet d'analyser qu'un polymorphisme à la fois.

Les études génétiques se font généralement chez l'homme et non pas sur les modèles *in vitro*. Les quelques études *in vitro* s'intéressent essentiellement aux génotypes de certaines lignées afin de les corréler avec les phénotypes exprimés par ces lignées. Par exemple, Coroneos et collaborateurs [115] ont étudié 5 polymorphismes du gène codant la N-acétyltransférase, une enzyme du métabolisme des médicaments, en parallèle à son expression dans les lignées U937 et HepG2 notamment. Namour F *et al.* [116] ont étudié la relation entre la sécrétion de transcobalamine par des cellules Caco2 et leur polymorphisme en position 259. De même, Sun *et al.* [117] ont étudié l'expression du facteur liant les répétitions télomériques (TRF1, telomeric repeat binding factor) et les génotypes correspondants dans plusieurs lignées (dont K562, HL60, U937 et Thp1) afin de déterminer si les mutations de cette protéine sont l'un des facteurs déterminant l'activation de la télomérase. Enfin, Bouker *et al.* [118] ont eux étudié le génotype de nombreuses lignées mammaires cancéreuses pour le polymorphisme A4396G du facteur 1 régulant l'interféron (*IRF1*), un potentiel gène suppresseur de tumeurs dans le cancer du sein, et ont ainsi montré une fréquence plus élevée de l'allèle muté dans ces lignées par rapport à la population générale, suggérant ainsi une association avec le cancer du sein. Par contre, il existe de nombreuses études d'expression et de régulation d'expression dans les cellules. Par exemple, nous savons que Kyn2 et HepG2 expriment un PPARγ fonctionnellement actif [119] ainsi que l'apolipoprotéine E [14] et Brandon et collaborateurs ont décrit l'expression des enzymes du métabolisme des médicaments et des transporteurs dans les lignées HepG2 et Caco2 [18].

La question de l'extrapolation à l'homme des données obtenues à l'aide de modèles *in vitro* est posée depuis le début de l'histoire de la culture cellulaire. La réalité montre que beaucoup de questions biologiques importantes sont résolues aujourd'hui grâce à la complémentarité des différents types d'approche *in vivo* et *in vitro*, qui s'enrichissent mutuellement, aussi bien techniquement que conceptuellement [12]. Même si les chercheurs tentent d'obtenir des modèles plus proches du tissu normal, les lignées d'origine cancéreuse restent très utilisées. D'une part, ces lignées présentent de nombreuses qualités, difficilement égalées, notamment en termes d'homogénéité de la population, de reproductibilité des résultats, de capacité de différenciation et de durée de vie [12]. Pour certains types cellulaires, ces lignées restent ainsi les seuls modèles différenciés disponibles. D'autre part, ces lignées

sont parfaitement connues de la communauté scientifique internationale et restent des modèles de référence.

Nous avons choisi pour ce travail 2 lignées monocytaires, 2 lignées myélocytaires, 2 lignées hépatocytaires et 1 lignée d'origine entérocytaire. Nous aurions pu sélectionner des lignées d'autres tissus d'intérêt dans le domaine cardio-vasculaire. Par exemple, la modélisation *in vitro* de cellules endothéliales permet de nombreuses études puisque ces cellules peuvent servir de modèles d'inflammation, de thrombogenèse et d'athérogenèse, de remodelage de la matrice extracellulaire ou encore d'angiogenèse. Cependant, les modèles les plus courants à l'heure actuelle sont des cultures primaires à durée de vie limitée, par exemple à partir de cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC, environ 3 passages possibles). Peu de lignées endothéliales immortalisées stables étant disponibles. De même, il n'y a pas de lignées continues de cellules musculaires cardiaques.

Il est nécessaire de noter que les lignées cellulaires continues, notamment celles étudiées dans ce travail, sont issues de cellules cancéreuses. Ces cellules peuvent avoir des problèmes de réparation de l'ADN et avoir fait l'objet de translocations chromosomiques. Les gènes situés dans ces régions transloquées peuvent donc faire l'objet d'anomalies d'expression. Enfin, les lignées cellulaires continues n'expriment pas forcément le même panel de gènes que le tissu dont elles proviennent. D'autre part, le tissu d'origine n'exprime pas forcément l'ensemble des gènes (bien que certains types d'expression soient inductibles). Il est alors peu intéressant de savoir que cette lignée est porteuse d'un polymorphisme dans un gène non exprimé. Par exemple, les molécules d'adhésion ne sont pas exprimées par le foie mais majoritairement par les cellules circulantes.

En conclusion, nous reportons dans ce travail les profils génétiques des lignées Thp1, U937, HL60, K562, HepG2, Kyn2 et Caco2 pour un certain nombre de polymorphismes de gènes impliqués dans l'initiation ou le développement des maladies cardio-vasculaires et dans la réponse au traitement de ces pathologies. Ce travail apportera des informations utiles au chercheur lors du choix d'une lignée pour un travail donné ou lors de l'interprétation des résultats observés dans ces modèles *in vitro*. Il serait intéressant de poursuivre ce travail par des études d'expression, dans ces lignées, de l'ARN et des protéines codés par ces gènes, ainsi que par des études d'expression des phénotypes d'intérêt modulés par les produits des gènes étudiés, afin d'affirmer l'importance des profils génétiques établis dans ce travail.

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

BIBLIOGRAPHIE

1. ANAES, *Méthode d'évaluation du risque cardio-vasculaire global.* 2004, Paris: Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé : p. 1-102.
2. Pallaud, C., R. Gueguen, et al., *Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas Cohort.* J Lipid Res, 2001. 42(11): p. 1879-90.
3. Le Morvan, V., J.L. Formento, et al., *Techniques de recherche des polymorphismes génétiques.* Oncologie, 2005. 7: p. 7-16.
4. Guo, Y. and D.C. Jamison, *The distribution of SNPs in human gene regulatory regions.* BMC Genomics, 2005. 6: p. 140.
5. Cheng, S., M.A. Grow, et al., *A multilocus genotyping assay for candidate markers of cardiovascular disease risk.* Genome Res, 1999. 9(10): p. 936-49.
6. Hoppe, C., S. Cheng, et al., *A novel multilocus genotyping assay to identify genetic predictors of stroke in sickle cell anaemia.* Br J Haematol, 2001. 114(3): p. 718-20.
7. Hoppe, C., W. Klitz, et al., *Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia.* Blood, 2004. 103(6): p. 2391-6.
8. Pallaud, C., C. Sass, et al., *APOC3, CETP, fibrinogen, and MTHFR are genetic determinants of carotid intima-media thickness in healthy men (the Stanislas cohort).* Clin Genet, 2001. 59(5): p. 316-24.
9. Maumus, S., B. Marie, et al., *Analysis of the effect of multiple genetic variants of cardiovascular disease risk on insulin concentration variability in healthy adults of the STANISLAS cohort. The role of FGB-455 G/A polymorphism.* Atherosclerosis, 2007. 191(2): p. 369-76.
10. Berrahmoune, H., B. Herbeth, et al., *Association between TNF and IL-1 bloc polymorphisms and plasma MCP-1 concentration.* Atherosclerosis, 2007. 192(2): p. 348-53.
11. Cheng, S., C. Pallaud, et al., *A multilocus genotyping assay for cardiovascular disease.* Clin Chem Lab Med, 1998. 36(8): p. 561-6.
12. Barlovatz-Meimon, G. and M. Adolphe, *Cultures de cellules animales, Méthodologies - Applications.* Techniques en ... 2003, Paris: Editions INSERM.
13. Bohnet, K., A. Regis-Bailly, et al., *Apolipoprotein E genotype epsilon 4/epsilon 2 in the STANISLAS Cohort Study--dominance of the epsilon 2 allele?* Ann Hum Genet, 1996. 60 (Pt 6): p. 509-16.
14. Brahimi, F., P. Bertrand, et al., *Control of apolipoprotein E secretion in the human hepatoma cell line KYN-2.* Cell Biochem Funct, 2001. 19(1): p. 51-8.
15. Auwerx, J., *The human leukemia cell line, THP-1: a multifacetted model for the study of monocyte-macrophage differentiation.* Experientia, 1991. 47(1): p. 22-31.
16. Maejima, T., H. Yamazaki, et al., *Effect of pitavastatin on apolipoprotein A-I production in HepG2 cell.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. 324(2): p. 835-9.
17. Vogel, C.F., E. Sciullo, et al., *Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates.* Environ Health Perspect, 2005. 113(11): p. 1536-41.
18. Brandon, E.F., T.M. Bosch, et al., *Validation of in vitro cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian*

carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines. Toxicol Appl Pharmacol, 2005.
19. Verstuyft, C., S. Strabach, et al., *Dipyridamole enhances digoxin bioavailability via P-glycoprotein inhibition.* Clin Pharmacol Ther, 2003. 73(1): p. 51-60.
20. Nagai, F., E. Kato, et al., *Oxidative stress induces GSTP1 and CYP3A4 expression in the human erythroleukemia cell line, K562.* Biol Pharm Bull, 2004. 27(4): p. 492-5.
21. Iwamoto, N., S. Abe-Dohmae, et al., *ATP-binding cassette transporter A1 gene transcription is downregulated by activator protein 2alpha. Doxazosin inhibits activator protein 2alpha and increases high-density lipoprotein biogenesis independent of alpha1-adrenoceptor blockade.* Circ Res, 2007. 101(2): p. 156-65.
22. Bansal, V. and P.K. Roychoudhury, *Production and purification of urokinase: a comprehensive review.* Protein Expr Purif, 2006. 45(1): p. 1-14.
23. Tsuchiya, S., M. Yamabe, et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).* Int J Cancer, 1980. 26(2): p. 171-6.
24. Fach, E.M., L.A. Garulacan, et al., *In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics.* Mol Cell Proteomics, 2004. 3(12): p. 1200-10.
25. Sundstrom, C. and K. Nilsson, *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937).* Int J Cancer, 1976. 17(5): p. 565-77.
26. Gallagher, R., S. Collins, et al., *Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia.* Blood, 1979. 54(3): p. 713-33.
27. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio, *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.* Blood, 1975. 45(3): p. 321-34.
28. Knowles, B.B., C.C. Howe, et al., *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen.* Science, 1980. 209(4455): p. 497-9.
29. Yano, H., M. Maruiwa, et al., *A new human pleomorphic hepatocellular carcinoma cell line, KYN-2.* Acta Pathol Jpn, 1988. 38(8): p. 953-66.
30. Abid, A., N. Sabolovic, et al., *Expression and inducibility of UDP-glucuronosyltransferases 1-naphthol in human cultured hepatocytes and hepatocarcinoma cell lines.* Life Sci, 1997. 60(22): p. 1943-51.
31. Honma, N., T. Genda, et al., *MEK/ERK signaling is a critical mediator for integrin-induced cell scattering in highly metastatic hepatocellular carcinoma cells.* Lab Invest, 2006. 86(7): p. 687-96.
32. Abid, A., N. Sabolovic, et al., *Inducibility of ethoxyresorufin deethylase and UDP-glucuronosyltransferase activities in two human hepatocarcinoma cell lines KYN-2 and Mz-Hep-1.* Cell Biol Toxicol, 1996. 12(2): p. 115-23.
33. Fogh, J., J.M. Fogh, et al., *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.* J Natl Cancer Inst, 1977. 59(1): p. 221-6.
34. Miller, S.A., D.D. Dykes, et al., *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.* Nucleic Acids Res, 1988. 16(3): p. 1215.
35. Cavaco, I., J.P. Gil, et al., *CYP3A4 and MDR1 alleles in a Portuguese population.* Clin Chem Lab Med, 2003. 41(10): p. 1345-50.
36. Tanabe, M., I. Ieiri, et al., *Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene.* J Pharmacol Exp Ther, 2001. 297(3): p. 1137-43.
37. Trompet, S., D. Pons, et al., *Genetic variation in the interleukin-10 gene promoter and risk of coronary and cerebrovascular events: the PROSPER study.* Ann N Y Acad Sci, 2007. 1100: p. 189-98.

38. Humphries, S.E., L.A. Luong, et al., *The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men.* Eur Heart J, 2001. 22(24): p. 2243-52.
39. Ozaki, K., Y. Ohnishi, et al., *Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction.* Nat Genet, 2002. 32(4): p. 650-4.
40. Shiau, M.Y., C.Y. Wu, et al., *TNF-alpha polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in Taiwanese patients.* Tissue Antigens, 2003. 61(5): p. 393-7.
41. Capoluongo, E., D. Pitocco, et al., *Slight association between type 1 diabetes and "ff" VDR FokI genotype in patients from the Italian Lazio Region. Lack of association with diabetes complications.* Clin Biochem, 2006. 39(9): p. 888-92.
42. Marti, G., L. Audi, et al., *[Association of vitamin D receptor gene polymorphism with type 1 diabetes mellitus in two Spanish populations].* Med Clin (Barc), 2004. 123(8): p. 286-90.
43. Zemunik, T., V. Skrabic, et al., *FokI polymorphism, vitamin D receptor, and interleukin-1 receptor haplotypes are associated with type 1 diabetes in the Dalmatian population.* J Mol Diagn, 2005. 7(5): p. 600-4.
44. Heidema, A.G., E.J. Feskens, et al., *Analysis of multiple SNPs in genetic association studies: comparison of three multi-locus methods to prioritize and select SNPs.* Genet Epidemiol, 2007.
45. Pai, J.K., P. Kraft, et al., *Polymorphisms in the CC-chemokine receptor-2 (CCR2) and -5 (CCR5) genes and risk of coronary heart disease among US women.* Atherosclerosis, 2006. 186(1): p. 132-9.
46. Szalai, C., J. Duba, et al., *Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients.* Atherosclerosis, 2001. 158(1): p. 233-9.
47. Quinones, M.P., H.G. Martinez, et al., *CC chemokine receptor 5 influences late-stage atherosclerosis.* Atherosclerosis, 2007.
48. Zee, R.Y., N.R. Cook, et al., *Polymorphism in the P-selectin and interleukin-4 genes as determinants of stroke: a population-based, prospective genetic analysis.* Hum Mol Genet, 2004. 13(4): p. 389-96.
49. Hoppe, C., W. Klitz, et al., *Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia.* Stroke, 2007. 38(8): p. 2241-6.
50. Beghe, B., S. Barton, et al., *Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population.* Clin Exp Allergy, 2003. 33(8): p. 1111-7.
51. Cui, T., J. Wu, et al., *Polymorphisms in the IL-4 and IL-4R [alpha] genes and allergic asthma.* Clin Chem Lab Med, 2003. 41(7): p. 888-92.
52. Rosner, S.A., P.M. Ridker, et al., *Interaction between inflammation-related gene polymorphisms and cigarette smoking on the risk of myocardial infarction in the Physician's Health Study.* Hum Genet, 2005. 118(2): p. 287-94.
53. Brassat, D., A.A. Motsinger, et al., *Multifactor dimensionality reduction reveals gene-gene interactions associated with multiple sclerosis susceptibility in African Americans.* Genes Immun, 2006. 7(4): p. 310-5.
54. Flex, A., E. Gaetani, et al., *Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke.* Stroke, 2004. 35(10): p. 2270-5.

55. Hamid, Y.H., C.S. Rose, et al., *Variations of the interleukin-6 promoter are associated with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes.* Diabetologia, 2005. 48(2): p. 251-60.
56. Zee, R.Y., N.R. Cook, et al., *Threonine for alanine substitution in the eotaxin (CCL11) gene and the risk of incident myocardial infarction.* Atherosclerosis, 2004. 175(1): p. 91-4.
57. Sbarsi, I., C. Falcone, et al., *Inflammation and atherosclerosis: the role of TNF and TNF receptors polymorphisms in coronary artery disease.* Int J Immunopathol Pharmacol, 2007. 20(1): p. 145-54.
58. Fernandez-Arquero, M., R. Arroyo, et al., *Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis.* Neurology, 1999. 53(6): p. 1361-3.
59. Ponthieux, A., D. Lambert, et al., *Association between Gly241Arg ICAM-1 gene polymorphism and serum sICAM-1 concentration in the Stanislas cohort.* Eur J Hum Genet, 2003. 11(9): p. 679-86.
60. Nejentsev, S., C. Guja, et al., *Association of intercellular adhesion molecule-1 gene with type 1 diabetes.* Lancet, 2003. 362(9397): p. 1723-4.
61. Penco, S., E. Grossi, et al., *Assessment of the role of genetic polymorphism in venous thrombosis through artificial neural networks.* Ann Hum Genet, 2005. 69(Pt 6): p. 693-706.
62. Djuric, T., M. Zivkovic, et al., *Endothelial NOS G894 T and MMP-3 5A/6A gene polymorphisms and hypertension in Serbian population.* J Clin Lab Anal, 2005. 19(6): p. 241-6.
63. Auer, J., T. Weber, et al., *Genetic polymorphisms in cytokine and adhesion molecule genes in coronary artery disease.* Am J Pharmacogenomics, 2003. 3(5): p. 317-28.
64. Testa, A., F.A. Benedetto, et al., *The E-selectin gene polymorphism and carotid atherosclerosis in end-stage renal disease.* Nephrol Dial Transplant, 2006. 21(7): p. 1921-6.
65. Wenzel, K., M. Ernst, et al., *DNA polymorphisms in adhesion molecule genes--a new risk factor for early atherosclerosis.* Hum Genet, 1996. 97(1): p. 15-20.
66. Volcik, K.A., C.M. Ballantyne, et al., *Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study.* Atherosclerosis, 2007.
67. Grainger, D.J., K. Heathcote, et al., *Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1.* Hum Mol Genet, 1999. 8(1): p. 93-7.
68. Sie, M.P., A.G. Uitterlinden, et al., *TGF-beta 1 polymorphisms and risk of myocardial infarction and stroke: the Rotterdam Study.* Stroke, 2006. 37(11): p. 2667-71.
69. Csaszar, A., J. Duba, et al., *Increased frequency of the C3*F allele and the Leiden mutation of coagulation factor V in patients with severe coronary heart disease who survived myocardial infarction.* Exp Clin Immunogenet, 2001. 18(4): p. 206-12.
70. Bernardo, E., D.J. Angiolillo, et al., *Influence of the CD14 C260T promoter polymorphism on C-reactive protein levels in patients with coronary artery disease.* Am J Cardiol, 2006. 98(9): p. 1182-4.
71. Giacconi, R., C. Caruso, et al., *CD14 C (-260)T polymorphism, atherosclerosis, elderly: role of cytokines and metallothioneins.* Int J Cardiol, 2007. 120(1): p. 45-51.
72. Porsch-Ozcurumez, M., J. Hucke, et al., *A post-hoc analysis on the CD14 C(-260)T promoter polymorphism and coronary heart disease.* Physiol Res, 2006.
73. Wang, X.B., X. Zhao, et al., *A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein.* Genes Immun, 2002. 3(4): p. 233-4.

74. Kokubo, Y., H. Tomoike, et al., *Association of sixty-one non-synonymous polymorphisms in forty-one hypertension candidate genes with blood pressure variation and hypertension.* Hypertens Res, 2006. 29(8): p. 611-9.
75. Benton, J.L., J. Ding, et al., *Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA).* Atherosclerosis, 2007. 193(2): p. 352-60.
76. Jensen, M.K., J.K. Pai, et al., *Common genetic variation in the ATP-binding cassette transporter A1, plasma lipids, and risk of coronary heart disease.* Atherosclerosis, 2007.
77. Tregouet, D.A., S. Ricard, et al., *In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(4): p. 775-81.
78. Hubacek, J.A., K.E. Berge, et al., *Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels.* Physiol Res, 2004. 53(4): p. 395-401.
79. Viturro, E., M. de Oya, et al., *Cholesterol and saturated fat intake determine the effect of polymorphisms at ABCG5/ABCG8 genes on lipid levels in children.* Genet Med, 2006. 8(9): p. 594-9.
80. Leschziner, G.D., T. Andrew, et al., *ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research.* Pharmacogenomics J, 2007. 7(3): p. 154-79.
81. Woodahl, E.L., Z. Yang, et al., *Multidrug resistance gene G1199A polymorphism alters efflux transport activity of P-glycoprotein.* J Pharmacol Exp Ther, 2004. 310(3): p. 1199-207.
82. Bosch, T.M., A.D. Huitema, et al., *Pharmacogenetic screening of CYP3A and ABCB1 in relation to population pharmacokinetics of docetaxel.* Clin Cancer Res, 2006. 12(19): p. 5786-93.
83. Xing, Q., R. Gao, et al., *Polymorphisms of the ABCB1 gene are associated with the therapeutic response to risperidone in Chinese schizophrenia patients.* Pharmacogenomics, 2006. 7(7): p. 987-93.
84. Marzolini, C., E. Paus, et al., *Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance.* Clin Pharmacol Ther, 2004. 75(1): p. 13-33.
85. Lai, C.Q., L.D. Parnell, et al., *The APOA1/C3/A4/A5 gene cluster, lipid metabolism and cardiovascular disease risk.* Curr Opin Lipidol, 2005. 16(2): p. 153-66.
86. Olivieri, O., C. Stranieri, et al., *ApoC-III gene polymorphisms and risk of coronary artery disease.* J Lipid Res, 2002. 43(9): p. 1450-7.
87. Xu, C.F., P. Talmud, et al., *Association between genetic variation at the APO AI-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidaemia.* Clin Genet, 1994. 46(6): p. 385-97.
88. Barzilai, N., G. Atzmon, et al., *Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity.* Jama, 2003. 290(15): p. 2030-40.
89. Thompson, J.F., M.E. Lira, et al., *Polymorphisms in the CETP gene and association with CETP mass and HDL levels.* Atherosclerosis, 2003. 167(2): p. 195-204.
90. Andersen, R.V., H.H. Wittrup, et al., *Hepatic lipase mutations,elevated high-density lipoprotein cholesterol, and increased risk of ischemic heart disease: the Copenhagen City Heart Study.* J Am Coll Cardiol, 2003. 41(11): p. 1972-82.
91. Guo, X., S. Cheng, et al., *Hypertension genes are genetic markers for insulin sensitivity and resistance.* Hypertension, 2005. 45(4): p. 799-803.
92. Barbato, E., A. Berger, et al., *GLU-27 variant of beta2-adrenergic receptor polymorphisms is an independent risk factor for coronary atherosclerotic disease.* Atherosclerosis, 2006.

93. Sethi, A.A., A. Tybjaerg-Hansen, et al., *164Ile allele in the beta2-Adrenergic receptor gene is associated with risk of elevated blood pressure in women. The Copenhagen City Heart Study.* Pharmacogenet Genomics, 2005. 15(9): p. 633-45.
94. Iaccarino, G., R. Izzo, et al., *Beta2-adrenergic receptor polymorphisms and treatment-induced regression of left ventricular hypertrophy in hypertension.* Clin Pharmacol Ther, 2006. 80(6): p. 633-45.
95. Leineweber, K., G. Tenderich, et al., *Is there a role of the Thr164Ile-beta(2)-adrenoceptor polymorphism for the outcome of chronic heart failure?* Basic Res Cardiol, 2006. 101(6): p. 479-84.
96. Vormfelde, S.V., D. Sehrt, et al., *Genetic variation in the renal sodium transporters NKCC2, NCC, and ENaC in relation to the effects of loop diuretic drugs.* Clin Pharmacol Ther, 2007. 82(3): p. 300-9.
97. Barcellos, L.F., A.B. Begovich, et al., *Linkage and association with the NOS2A locus on chromosome 17q11 in multiple sclerosis.* Ann Neurol, 2004. 55(6): p. 793-800.
98. Howard, T.D., W.H. Giles, et al., *Promoter polymorphisms in the nitric oxide synthase 3 gene are associated with ischemic stroke susceptibility in young black women.* Stroke, 2005. 36(9): p. 1848-51.
99. Berger, K., F. Stogbauer, et al., *The glu298asp polymorphism in the nitric oxide synthase 3 gene is associated with the risk of ischemic stroke in two large independent case-control studies.* Hum Genet, 2007. 121(2): p. 169-78.
100. Dedoussis, G.V., S. Maumus, et al., *Natriuretic peptide Val7Met substitution and risk of coronary artery disease in Greek patients with familial hypercholesterolemia.* J Clin Lab Anal, 2006. 20(3): p. 98-104.
101. Pongracz, E., H. Andrikovics, et al., *Contribution of the -455G/A polymorphism at beta-fibrinogen gene and of the Leiden mutation to hemorheological parameters in ischemic stroke patients.* Clin Hemorheol Microcirc, 2006. 35(1-2): p. 75-82.
102. Kathiresan, S., Q. Yang, et al., *Common genetic variation in five thrombosis genes and relations to plasma hemostatic protein level and cardiovascular disease risk.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(6): p. 1405-12.
103. Boekholdt, S.M., N.R. Bijsterveld, et al., *Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: a systematic review.* Circulation, 2001. 104(25): p. 3063-8.
104. Morange, P.E., N. Saut, et al., *Association of Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)-1 (SERPINE1) SNPs with Myocardial Infarction, Plasma PAI-1, and Metabolic Parameters. The HIFMECH Study.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007.
105. Noble, J.A., A.M. White, et al., *A polymorphism in the TCF7 gene, C883A, is associated with type 1 diabetes.* Diabetes, 2003. 52(6): p. 1579-82.
106. Taverna, M.J., J.L. Selam, et al., *Association between a protein polymorphism in the start codon of the vitamin D receptor gene and severe diabetic retinopathy in C-peptide-negative type 1 diabetes.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. 90(8): p. 4803-8.
107. Ongagna, J.C., M. Pinget, et al., *Vitamin D-binding protein gene polymorphism association with IA-2 autoantibodies in type 1 diabetes.* Clin Biochem, 2005. 38(5): p. 415-9.
108. Klos, K.L., C.F. Sing, et al., *Consistent effects of genes involved in reverse cholesterol transport on plasma lipid and apolipoprotein levels in CARDIA participants.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(8): p. 1828-36.
109. Knoblauch, H., A. Bauerfeind, et al., *Haplotypes and SNPs in 13 lipid-relevant genes explain most of the genetic variance in high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol.* Hum Mol Genet, 2004. 13(10): p. 993-1004.

110. Chasman, D.I., D. Posada, et al., *Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction.* Jama, 2004. 291(23): p. 2821-7.
111. Schmitz, G. and T. Langmann, *Pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy.* Vascul Pharmacol, 2006. 44(2): p. 75-89.
112. Thompson, J.F., M. Man, et al., *An association study of 43 SNPs in 16 candidate genes with atorvastatin response.* Pharmacogenomics J, 2005. 5(6): p. 352-8.
113. Fiegenbaum, M., F.R. da Silveira, et al., *The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment.* Clin Pharmacol Ther, 2005. 78(5): p. 551-8.
114. Maitland-van der Zee, A.H., B.H. Stricker, et al., *Adherence to and dosing of beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in the general population differs according to apolipoprotein E-genotypes.* Pharmacogenetics, 2003. 13(4): p. 219-23.
115. Coroneos, E. and E. Sim, *Arylamine N-acetyltransferase activity in human cultured cell lines.* Biochem J, 1993. 294 (Pt 2): p. 481-6.
116. Namour, F., J. Olivier, et al., *Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood.* Blood, 2001. 97(4): p. 1092-8.
117. Sun, J., H. Huang, et al., *Study on the expression and mutation of human telomeric repeat binding factor (hTRF1) in 10 malignant hematopoietic cell lines.* J Zhejiang Univ Sci B, 2005. 6(12): p. 1141-7.
118. Bouker, K.B., T.C. Skaar, et al., *The A4396G polymorphism in interferon regulatory factor 1 is frequently expressed in breast cancer cell lines.* Cancer Genet Cytogenet, 2007. 175(1): p. 61-4.
119. Rumi, M.A., H. Sato, et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma.* Br J Cancer, 2001. 84(12): p. 1640-7.
120. Yu, L., J. Cecil, et al., *Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1.* Gene, 2006. 374: p. 174-9.
121. Coll, B., C. Alonso-Villaverde, et al., *The stromal derived factor-1 mutated allele (SDF1-3'A) is associated with a lower incidence of atherosclerosis in HIV-infected patients.* Aids, 2005. 19(16): p. 1877-83.
122. Shijubo, N., I. Kawabata, et al., *Clinical aspects of Clara cell 10-kDa protein/ uteroglobin (secretoglobin 1A1).* Curr Pharm Des, 2003. 9(14): p. 1139-49.
123. Berge, K.E., H. Tian, et al., *Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters.* Science, 2000. 290(5497): p. 1771-5.
124. Zineh, I., A.L. Beitelshees, et al., *Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension.* Clin Pharmacol Ther, 2004. 76(6): p. 536-44.

201. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database, page consultée le 13/09/07, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez
202. Uniprot Knowledge database, page consultée le 13/09/07, http://www.expasy.uniprot.org/database/knowledgebase.shtml

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

ANNEXE 1 : PRESENTATION DES GENES IMPLIQUES EN PHYSIOPATHOLOGIE CARDIOVASCULAIRE ETUDIES.

Symbol	OMIM [201]	Gene Map Locus	Subcellular location (UniProt Knowledgebase [202] except if indicated)	Roles and Disorders (OMIM [201] except if indicated)
INFLAMMATION				
CCR2	601267	3p21	Produced by endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages	Receptor for MCP1, MCP3 and MCP4. May be involved in inflammatory processes in rheumatoid arthritis, alveolitis, and tumor infiltration. May also be an important component of monocyte invasion of artery walls in atherosclerosis [47]
CCR3	601268	3p21.3	Eosinophils. Trace amounts in neutrophils and monocytes	Binds to eotaxin, eotaxin 3, MCP3, MCP4, RANTES and MIP1 delta. Complex role in allergic disease
CCR5	601373	3p21	Predominantly expressed on T cells, macrophages, dendritic cells and microglia	Binds to MIP1α, MIP1β and RANTES. May play a role in inflammatory responses to infection and in the initiation of atherosclerotic plaques [47]
CSF2	138960	5q31.1	Secreted by macrophages, T cells, mast cells, endothelial cells and fibroblasts	Cytokine. Stimulates the growth and differentiation of hematopoietic precursor cells from various lineages, including granulocytes, macrophages, eosinophils and erythrocytes. Susceptibility to atopic asthma
IL10	124092	1q31-q32	Produced by a variety of cell lines, including T-cells, macrophages and mast cells	Inhibits the synthesis of a number of cytokines. Antiinflammatory effects. May arrest and reverse the chronic inflammatory response in established atherosclerosis. IL10 levels are associated with the metabolic syndrome
IL13	147683	5q31	Expressed in activated human T lymphocytes	Inhibits inflammatory cytokine production. May be critical in regulating inflammatory and immune responses.
IL1A	147760	2q14	Synthesized by a variety of cell types including activated macrophages, keratinocytes, stimulated B lymphocytes, and fibroblasts	Potent mediator of inflammation and immunity
IL1B	147720	2q14	Synthesized by a variety of cell types including activated macrophages, keratinocytes, stimulated B lymphocytes, and fibroblasts	Potent mediators of inflammation and immunity
IL4	147780	5q31.1	Th2 cells	Key regulator in humoral and adaptive immunity. Many biological roles
IL4R	147781	16p12.1-p11.2	Activated T-cells (2 isoforms)	Receptor for both IL4 and IL13. Involved in promoting Th2 differentiation,regulating IgE production and chemokine and mucus production at sites of allergic inflammmation. Susceptibility to atopy
IL5RA	147851	3p26-p24	Expressed on eosinophils and basophils	Receptor for IL5
IL6	147620	7p21	T cells and macrophages, muscles, osteoblasts	Pro-inflammatory cytokine with a wide variety of biological functions. One of the most important mediators of fever and of the acute phase response. Osteopenia/osteoporosis; susceptibility to Kaposi sarcoma
IL9	146931	5q31.1	Produced by CD4+ helper cells	May serve as a regulator of both lymphoid and myeloid systems
LTA	153440	6p21.3	Secreted by activated lymphocytes	Presumed to act as a modulator in the immune response. Associated with susceptibility to myocardial infarction
SCYA11	601156	17q21.1-q21.2	Expressed in pancreas (http://hdbase.org)	Binds to CCR3. Promotes the accumulation of eosinophils. May contribute to angiogenesis in conditions accompanied by eosinophil infiltration such as Hodgkin lymphoma, endometriosis, and allergic diathesis

Symbol	OMIM	Gene Map Locus	Subcellular location (UniProt Knowledgebase except if indicated)	Roles and Disorders (OMIM except if indicated)
SDF1	600835	10q11.1	Highest expression were detected in liver, pancreas and spleen [120]	Chemoattractant active on T-lymphocytes and monocytes. May have a role in immune surveillance and in basal extravasation of lymphocytes and monocytes rather than in inflammation. Highly expressed in atherosclerotic plaques [121]
TNFα	191160	6p21.3	Secreted predominantly by monocytes/macrophages	Multifunctional proinflammatory cytokine that has effects on lipid metabolism, coagulation, insulin resistance, and endothelial function. Susceptibility to cerebral malaria, septic shock, asthma, vascular dementia, migraine
UGB	192020	11q12.3-q13.1	Expressed by most cells of epithelial origin	Putative role: immunoregulatory and anti-inflammatory in innate immunity [122]. Asthma susceptibility
CELLULAR ADHESION				
ICAM1	147840	19p13.3-p13.2	Expressed by the vascular endothelium, macrophages and lymphocytes	Ligand for lymphocyte function-associated antigens. Susceptibility to cerebral malaria
MMP3	185250	11q23	Produced predominantly by connective tissue cells	Involved in connective tissue remodeling during atherogenesis. Susceptibility to coronary heart disease
SELE	131210	1q23-q25	Expressed only on endothelial cells activated by cytokines	Recruitment of blood leukocytes at sites of inflammation by mediating the adhesion of cells to the vascular lining. Marker for the atherosclerotic plaque in the vasculature. Blood pressure regulation
SELP	173610	1q23-q25	Endothelial cells and activated platelets	Essential role in the initial recruitment of leukocytes to the site of injury during inflammation. Expression was found to be significantly and positively correlated with carotid artery stiffness and wall thickness. Expression is increased in atherosclerotic plaques, and high plasma levels of this molecule are found in patients with unstable angina
VCAM1	192225	1p32-p31	Expressed only on endothelial cells activated by cytokines	Cell surface glycoprotein. Promotes the adhesion of lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils. Increased serum levels of soluble VCAM1 predicted recurrent ischemic stroke
GROWTH FACTOR				
TGFB1	190180	19q13.1	Highly expressed in bone	Controle proliferation, differentiation, and other functions in many cell types. It regulates the actions of many other growth factors and determines a positive or negative direction of their effects. It plays an important role in bone remodelling. Hyperexpression might be a risk factor for HTA and hypertensive complications
IMMUNE SYSTEM				
C3	120700	19p13.3-p13.2	Liver is the main site of synthesis. Small amounts also produced by activated monocytes	Acute phase reactant. Increased synthesis of C3 is induced during acute inflammation. C3 deficiency
C5	120900	9q34.1	Liver, tonsils, brain and bone marrow (GENATLAS database http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/)	It is cleaved into C5a and C5b: C5a plays an important role in chemotaxis & C5b forms the first part of the complement membrane attack complex. Deficiency of C5 might lead to an anti-inflammatory phenotype. Susceptibility to liver fibrosis
CD14	158120	5q31.1	Expressed on the surface of monocytes and of granulocytes and by most tissue macrophages	Important receptor of innate immunity, leading to NFκB activation, cytokine secretion and the inflammatory response. Up-regulates cell surface molecules, including adhesion molecules
CTLA4	123890	2q33	Widely expressed with highest levels in lymphoid tissues	Possibly involved in T-cell activation. Susceptibility to diseases including diabetes mellitus insulin-dependent
FCER1B	147138	11q13	Expressed on mast cells and basophils	The high affinity IgE receptor is responsible for initiating the allergic response. Susceptibility to atopy

Symbol	OMIM	Gene Map Locus	Subcellular location (UniProt Knowledgebase except if indicated)	Roles and Disorders (OMIM except if indicated)
LIPIDS METABOLISM				
ABCA1	600046	9q22-q31	Widely expressed, but most abundant in macrophages	Cholesterol efflux pump in the cellular lipid removal pathway.Tangier disease, familial HDL deficiency, coronary artery disease in familial hypercholesterolemia
ABCB1	171050	7q21.1	Expressed mainly in liver, kidney, intestine & brain	Efflux a variety of drugs from the cells back into the blood. Drug resistance. Role in cholesterol homeostasis?
ABCG8	605460	2p21	Expressed at a high level in the liver and at lower levels in the small intestine and colon	Limits intestinal absorption and promotes biliary excretion of sterols. Mutated forms of this transporter predispose to sterol accumulation and atherosclerosis [123]
ApoAIV	107690	11q23	Synthesized in the intestine and secreted in plasma	Component of chylomicrons and HDL. Required for efficient activation of lipoprotein lipase by ApoC-II; potent activator of LCAT. Disorder of lipid metabolism
ApoB	107730	2p24	Occurs in the plasma in 2 main forms, apoB48 (gut) and apoB100 (liver)	Major protein constituent of chylomicrons (apo B48), LDL (apo B100) and VLDL (apo B100). Apo B100 functions as a recognition signal for the cellular binding and internalization of LDL particles by the apoB/E receptor. Disorder of lipid metabolism
ApoCIII	107720	11q23	Synthesized predominantly in liver and to a lesser degree in intestine	Constitutes 50% of the protein fraction of VLDL and 2% of that of HDL. Inhibits lipoprotein lipase and hepatic lipase and decreases the uptake of lymph chylomicrons by hepatic cells. This suggests that it delays the catabolism of triglyceride-rich particles. Disorder of lipid metabolism and disturbance of glucose homeostasis
ApoE	107741	19q13.2	Significant quantities are produced in liver, brain, spleen, lung, adrenal, ovary, kidney and muscle. Secreted protein	Occurs in all lipoprotein fractions in plasma. Essential for the normal catabolism of triglyceride-rich lipoprotein constituents. Major isoforms of human apolipoprotein E (apoE2, -E3, and -E4) are coded for by 3 alleles (epsilon 2, 3, and 4). Disorder of lipid metabolism. Familial dysbetalipoproteinemia, characterized by elevated plasma cholesterol and triglyceride levels and an increased risk for atherosclerosis. Susceptibility to CAD
CETP	118470	16q21	Expressed by the liver and secreted in plasma	Involved in the transfer of insoluble cholesteryl esters in the reverse transport of cholesterol from HDL to other lipoproteins. Defects is associated with increased HDLc levels. Association with CVD
LDLR	606945	19p13.2	Widely expressed	Cell surface receptor that binds LDL and transports it into cells by endocytosis. The receptor defect (familial hypercholesterolemia) impairs the catabolism of LDL, and the resultant elevation in plasma LDLc promotes deposition of cholesterol in the skin (xanthelasma), tendons (xanthomas), and coronary arteries (atherosclerosis)
LIPC	151670	15q21-q23	?	Catalyzes hydrolysis of phospholipids, mono-, di-, and triglycerides, and acyl-CoA thioesters. Important enzyme in HDL metabolism. Hepatic lipase deficiency associated to some genetic variants
LPA	152200	6q27	Assembled in the blood from LDL molecules and glycoprotein molecules called apolipoprotein-a	High plasma lipoprotein (a) concentrations are an independent risk factor for atherosclerotic diseases. Hyperlipoproteinemia. Striking similarities to human plasminogen
LPL	609708	8p22	Endothelial cells, liver, macrophages & adipocytes	Hydrolysis of TG of circulating chylomicrons and VLDL. Deficiency in LPL leads to hypertriglyceridemia and to familial hyperlipoproteinemia type I (hyperchylomicronemia)

Symbol	OMIM	Gene Map Locus	Subcellular location (UniProt Knowledgebase except if indicated)	Roles and Disorders (OMIM except if indicated)
BLOOD PRESSURE				
Renin-Angiotensin System				
ACE	106180	17q23	Ubiquitously expressed. Highest levels in lung, kidney, heart, gastrointestinal system and prostate	Blood pressure, electrolyte balance and neurohormonal regulation. Candidate gene in hypertension (HTA)
AGT	106150	1q42-q43	Expressed by the liver and secreted in plasma	Angiotensin precursor. Blood pressure, electrolyte balance and neurohormonal regulation. Candidate gene in HTA
AGT1R	106165	3q21-q25	Predominate in many tissues	Mediate the major cardiovascular effects of angiotensin II. Blood pressure, electrolyte balance and neurohormonal regulation. Candidate gene in HTA
Adrenergic-cholinergic receptors				
ADRB2	109690	5q32-q34	No data	Adrenergic mediated vascular dilatation. May contribute to beta-amyloid accumulation in Alzheimer disease [124]
ADRB3	109691	8p12-p11.2	Located mainly in adipose tissue	Regulation of lipolysis and thermogenesis. Potential relevance of this receptor to obesity
GNB3	139130	12p13	Expressed in all tissues	Contribution to G protein activity. Susceptibility to hypertension
Sodic System				
ADD1	102680	4p16.3	Ubiquitous expression, kidneys ++	Ion transport. Susceptibility to hypertension [124]
SCNN1A	600228	12p13	Nephrons	Supports sodium conductance. Susceptibility to hypertension
Arachidonic Acid Metabolism				
LTC4S	246530	5q35	Activity is present in eosinophils, basophils, mast cells, phagocytic mononuclear cells, endothelial cells, vascular smooth muscle cells, and platelets	Catalyzes the conjugation of LTA4 with reduced glutathione to form LTC4 (potent proinflammatory mediator)
Vasodilatation				
NPPA	108780	1p36.2	Atrial tissue, brain	Natriuretic-diuretic activity. Control of extracellular fluid volume & electrolyte homeostasis. Susceptibility to HTA
NOS2A	163730	17cen-q11.2	Expressed in the liver, retina, bone cells and airway epithelial cells of the lung	Nitric oxide (NO) synthesis. NO is a messenger molecule with diverse functions such as blood pressure regulation. NOS2-derived NO is a prerequisite for cytokine signaling and function in innate immunity. Molecular synergism between NOS2 and COX2 may represent a major mechanism of inflammatory responses
NOS3	163729	7q36	Platelets, placenta, liver and kidney	NO synthesis. Variations in NOS3 seem to be associated with susceptibility to coronary spasm and might modulate blood pressure [62]
COAGULATION				
FII	176930	11p11-q12	Liver	Converts soluble fibrinogen into insoluble strands of fibrin, and catalyzing many other coagulation-related reactions. Coagulation abnormalities
FV	227400	1q23	Liver	Essential cofactor for the factor Xa-catalyzed activation of prothrombin to the clotting enzyme thrombin. Coagulation abnormalities
FVII	227500	13q34	Liver	Initiate the process of coagulation in conjunction with tissue factor. Coagulation abnormalities

Symbol	OMIM	Gene Map Locus	Subcellular location (UniProt Knowledgebase except if indicated)	Roles and Disorders (OMIM except if indicated)
FGB	134830	4q28	Liver	Conversion into fibrin which is then cross linked by factor XIII to form a clot. Coagulation abnormalities
GP1a	192974	5q23-q31	Liver, platelets	Plays a role in the attachment of a cell to the extracellular matrix (ECM) and to other cells, and in signal transduction from the ECM to the cell
GPIIIa	173470	17q21.32	Liver, platelets	Adhesion and platelets aggregation
PAI1	173360	7q21.3-q22	Mainly endothelium	Fibrinolysis inhibitor through inhibition of tissue plasminogen activator and urokinase. Coagulation abnormalities
Homocystein metabolism				
CBS	236200	21q22.3	Strongly expressed in liver and pancreas, some expression in heart and brain, weak expression in lung and kidney	The reaction catalyzed by CBS is the committed step in the synthesis of cysteine from methionine by transsulfuration. Deficiency of CBS results in hyperhomocysteinemia, increased urinary homocysteine and methionine and with complications in the cardiovascular system leading to early and aggressive arterial disease
MTHFR	607093	1p36.3	Widely expressed including lymph node, spleen, bone marrow (GENATLAS database http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/)	Catalyzes the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, a cosubstrate for homocysteine remethylation to methionine. Deficiency of MTHFR results in hyperhomocysteinuria. Polymorphism C577T and mild hyperhomocysteinemia are associated with neural tube defects in offspring, arterial and venous thrombosis and CV disease
OXYDATIVE STRESS				
PON1	168820	7q21.3	Expressed by the liver. Associated with HDL in the plasma	May mediates an enzymatic protection of LDL against oxidative modification and the consequent series of events leading to atheroma formation. Susceptibility to coronary artery disease (CAD) and to coronary artery spasm
PON2	602447	7q21.3	Widely expressed, with highest expression in liver, lung, placenta, testis and heart	Prevents LDL lipid peroxidation and reverses the oxidation of mildly oxidized LDL. Susceptibility to CAD
TRANSCRIPTION FACTORS				
PPAR gamma	601487	3p25	Highest expression in adipose tissue. Lower in skeletal muscle, spleen, heart and liver. Also detectable in placenta, lung and ovary	Receptor that binds peroxisome proliferators such as hypolipidemic drugs and fatty acids. Controls the peroxisomal beta-oxidation pathway of fatty acids. Key regulator of adipocyte differentiation and glucose homeostasis. Obesity, diabetes mellitus, insulin resistance, lipodystrophy (modifier of abdominal body fat distribution)
TCF7	189908	5q31.1	Predominantly expressed in T- and NK-cells [105]	Activates genes involved in immune regulation and is a candidate locus for genetic susceptibility to type 1 diabetes. Affects expression of genes important to Th1 responses, such as the IL12R 2 subunit. Because type 1 diabetes is a Th1-mediated disease, TCF7 might reasonably be expected to influence type 1 diabetes [105]
VDR	601769	12q12-q14	Expressed in most tissues	Produces a variety of biologic effects. Mediates the action of vitamin D3 by controlling the expression of hormone sensitive genes. Effect on bone marrow density, susceptibility to osteoporosis, type 1 diabetes, grave's disease, …
OTHERS				
GC	139200	4q12	Found on the surface of many cell types	Multifunctional protein. Major carrier protein of vitamin D in the circulation, and deglycosylation converts it into a very potent macrophage- and osteoclast-activating factor. Susceptibility to Graves disease, influence on glucose metabolism (might contribute to the development of type 2 diabetes)

CAD coronary artery disease, HTA Hypertension

ANNEXE 2 : PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE PROPRES A CHAQUE LIGNEE CELLULAIRE.

Composition du milieu par lignée	Volume
THP1	
RPMI 1640 sans L glutamine, sans rouge de phénol	500 ml
L Glutamine 200 mM	5 ml
Sodium Pyruvate 100 mM	5 ml
Hepes 1 M	5 ml
Penicilline 10000 U/ml, Streptomycine 10000 µg/ml, Amphotericine B 25µg/ml	5 ml
D glucose 45%	2.7 ml
β-mercaptoethanol 50 mM	0.5 ml
SVF décomplémenté	58 ml
U937	
RPMI 1640 sans L glutamine, sans rouge de phénol	500 ml
L Glutamine 200 mM	5 ml
Sodium Pyruvate 100 mM	5 ml
Hepes 1 M	5 ml
Penicilline 10000 U/ml, Streptomycine 10000 µg/ml, Amphotericine B 25µg/ml	5 ml
D glucose 45%	2.7 ml
SVF décomplémenté	58 ml
HEPG2	
MEM avec Earle's salts, sans L-glutamine, sans rouge de phénol	500 ml
L Glutamine 200 mM	5 ml
Sodium Pyruvate 100 mM	5 ml
Acides Aminés Non Essentiels 100X, sans L-glutamine	5 ml
Penicilline 10000 U/ml, Streptomycine 10000 µg/ml, Amphotericine B 25µg/ml	5 ml
SVF décomplémenté	58 ml
HL60	
RPMI 1640 BLANC sans glutamine et sans rouge de phénol	500 ml
L Glutamine 200 mM	5 ml
Penicilline 10000 U/ml, Streptomycine 10000 µg/ml, Amphotericine B 25µg/ml	5 ml
SVF décomplémenté	90 ml
Caco2	
MEM avec Earle's salts, sans L-glutamine, sans rouge de phénol	500 ml
L Glutamine 200 mM	5 ml
Sodium Pyruvate 100 mM	5 ml
Acides Aminés Non Essentiels 100X, sans L-glutamine	5 ml
Penicilline 10000 U/ml, Streptomycine 10000 µg/ml, Amphotericine B 25µg/ml	5 ml
SVF décomplémenté	130 ml
K562	
RPMI 1640 sans rouge de Phénol et sans L-glutamine	500 ml
L Glutamine 200 mM	5 ml
Penicilline 10000 U/ml, Streptomycine 10000 µg/ml, Amphotericine B 25µg/ml	5 ml
SVF décomplémenté	57 ml
Kyn2	
DMEM avec rouge de Phénol, Glucose et L-glutamine et sans pyruvate de sodium	500 ml
Penicilline 10000 U/ml, Streptomycine 10000 µg/ml, Amphotericine B 25µg/ml	5 ml
SVF décomplémenté	56 ml

ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE DECONGELATION D'UNE LIGNEE CELLULAIRE.

Les cellules sont conservées dans l'azote liquide en ampoule dans 90 % de milieu complet (ou de SVF) et 10% de DMSO. La décongélation doit-être le plus rapide possible pour éviter la souffrance cellulaire. Le protocole est le suivant :

- Préparer sous la hotte un tube de 50 ml (Corning®) contenant 40 mL de milieu complet (un tube par ampoule). Garder également sous la hotte le flacon de milieu complet.
- Sortir le cryotube de l'azote liquide et le plonger le plus rapidement possible dans le bain Marie à 37°C. Laisser décongeler moins d'une minute, jusqu'apparition d'un gros glaçon.
- Sous la hotte, prélever le liquide du cryotube et le verser dans le tube contenant le milieu.
- Prélever 2 ml de ce milieu pour finir de décongeler le glaçon de cellules par homogénéisation. Prélever le restant du cryotube et le verser dans le tube Corning ®.
- Centrifuger 5 minutes à 400g pour enlever le DMSO (toxique pour les cellules une fois décongelées) et les débris cellulaires (les cellules mortes, plus légères, flottent).
- Vider le surnageant. Ajouter quelques gouttes de milieu au culot. Homogénéiser.
- Prélever cet homogénat et le verser dans la flasque contenant déjà 18 mL de milieu de culture.
- Inscrire sur le coté de la flasque le n° passage, la lignée cellulaire et la date.
- Coucher la flasque horizontalement et remuer doucement.
- Placer la flasque sous le microscope inversé pour visualiser les cellules.
- Placer la flasque à l'étuve.

ANNEXE 4 : PROTOCOLE DE NUMERATION CELLULAIRE.

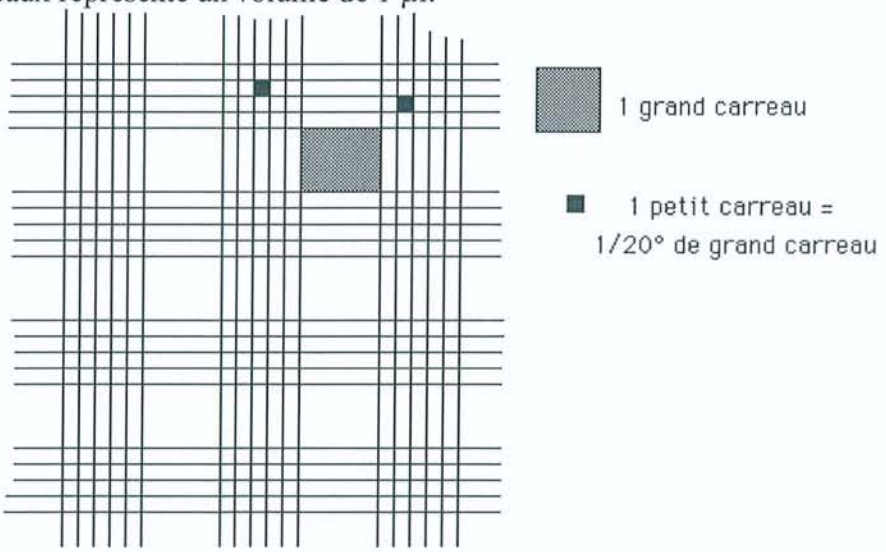
La numération se fait en utilisant une lame de Malassez. Les prélèvements riches en cellules sont comptés après une dilution adéquate.

a. Préparation de la dilution

Dans un tube, mélanger x µl de milieu, y µl de suspension et z µl de bleu de Trypan 0.4% (Gibco ®) qui va colorer les cellules mortes en bleu (car l'intégrité de la membrane n'est plus respectée). Les volumes dépendent de la dilution à effectuer. Celle-ci est choisie par estimation de la densité cellulaire au microscope. Par exemple, pour une dilution au $1/10^{e}$, on prendra : 400 µL de milieu, 50 µL de suspension de cellules, et 50 µL de bleu Trypan 0.4% (Gibco ®). Prélever la suspension et la déposer sur la lame de Malassez préalablement montée.

b. Comptage

La lame de Malassez est composée de 100 rectangles (10 lignes et 10 colonnes), délimitant en fait 100 grands carreaux, dont certains sont subdivisés en 20 petits carreaux. L'ensemble des 100 grands carreaux représente un volume de 1 µl.



- Repérer le 1er rectangle en haut et à gauche du quadrillage.
- Effectuer par ligne le comptage des cellules vivantes et mortes à l'objectif 40. Pour les éléments situés sur deux carrés, on ne compte que ceux qui sont du côté droit et du côté inférieur (pour éviter de les compter deux fois).
- Le nombre minimum de cellules à compter est de 100 pour une évaluation valable. Si ce chiffre n'est pas atteint, il faut refaire une dilution plus faible.
- Nombre de cellules /mL = (nombre de cellules/nombre de lignes lues) ×10 ×Dilution ×1000.
- Les cellules vivantes sont claires et réfringentes tandis que les cellules colorées en bleu sont mortes. En principe, la préparation ne doit pas contenir plus de 10% de cellules mortes sauf après décongélation.

ANNEXE 5 : PREPARATION DES REACTIFS NECESSAIRES A L'EXTRACTION D'ADN.

Réactifs de base

- Tampon Tris 1 M : ..... 121 g/l
  Ajuster les pH à 7,4 ou 8,2 avec HCl 6 M
- EDTA (sel de Na) (0,5 M) : ..... 18,6 g/l
  Pour dissolution complète, ajuster pH entre 8-8,3 avec NaOH
- NaCl 5 M : ..... 292,5 g/l
- NaCl 6 M (solution saturée) : ..... 350 g/l
- SDS 10 % : ..... 100 g/l

Solutions de travail

- *Tampon STE (hypotonique) :*
  - Tris HCl 1 M, pH 7,4 : ..... 20 ml
  - EDTA O,5 M : ..... 0,2 ml
  - NaCl 5 M : ..... 2 ml
  - Eau bidistillée q.s.p. : ..... 1 l

- *Tampon de lyse :*
  - Tris HCl 1 M, pH 8,2 : ..... 10 ml
  - EDTA O,5 M : ..... 4 ml
  - NaCl 5 M : ..... 80 ml
  - Eau bidistillée q.s.p. : ..... 1 l

- *Tampon d'extraction TE :*
  - Tris HCl 10 mM, pH 7,4 : ..... 500µl solution mère à 2 M
  - EDTA 0,1 mM, pH 8: ..... 20µl solution mère à 0,5M
  - Eau bidistillée q.s.p : ..... 1 l

- *Protéinase K [1mg/ml] :*
  - EDTA O,5 M : ..... 20 ml
  - SDS 10 % : ..... 10 ml
  - Protéinase K (20 U/mg) : ..... 100 mg
  - Eau bidistillée q.s.p. : ..... 100 ml

- *Ethanol 70 % :*
  - Ethanol absolu : ..... 700 ml
  - Eau bidistillée q.s.p. : ..... 1 l

ANNEXE 6 : CODIFICATION DES RESULTATS DE GENOTYPAGE PAR PCR MULTIPLEX.

ND Non déterminé

Multiplex IIA	Thp1	U937	HL60	HepG2	K562	Kyn2	Caco2
apoa G121	0	1	1	1	1	1	0
apoa 121A	1	1	0	0	1	1	1
apoAIV thr347	1	1	1	1	1	1	1
apoAIV 347glu	0	1	0	0	0	0	0
apoAIV glu360	1	1	1	1	1	1	1
apoAIV 360his	0	0	0	0	0	0	0
apoB thr71	1	1	1	1	1	1	1
apoB 71ile	0	1	0	1	1	0	0
apoB arg3500	1	1	1	1	1	1	1
apoB 3500gln	0	0	0	0	0	0	0
apoCIII C-641	1	1	1	1	1	0	1
apoCIII -641A	0	1	0	0	1	1	0
apoCIII C-482	1	1	1	1	1	0	1
apoCIII -482T	0	1	0	0	0	1	0
apoCIII T-455	1	1	1	1	1	0	1
apoCIII -455C	0	1	0	0	1	1	0
apoCIII C1100	1	1	0	1	1	1	0
apoCIII 1100T	0	0	1	1	1	0	1
apoCIII C3175	1	1	1	1	1	1	1
apoCIII 3175G	0	0	0	0	0	0	0
apoCIII T3206	1	1	0	1	0	0	0
apoCIII 3206G	1	0	1	1	1	1	1
apoE cys112	1	0	1	1	1	1	1
apoE 112arg	0	1	0	0	0	0	0
apoE arg158	1	1	1	1	1	1	1
apoE 158cys	0	0	0	0	0	0	0
ADRB3 trp64	1	1	1	1	1	1	0
ADRB3 64arg	0	0	0	1	0	0	1
PPAR pro12	1	1	1	1	1	1	1
PPAR 12ala	0	0	0	0	0	0	0
LIPH C-480	0	1	1	1	1	0	1
LIPH -480T	1	0	0	1	0	1	0
LPL T-93	1	1	1	1	1	1	1
LPL-93G	0	0	0	0	0	0	0

Multiplex IIA (suite)	Thp1	U937	HL60	HepG2	K562	Kyn2	Caco2
LPL asp9	1	1	1	1	1	1	1
LPL 9asn	0	0	0	0	0	0	0
LPL asn291	1	1	1	1	1	1	1
LPL 291ser	0	0	0	0	0	0	0
LPL ser447	1	1	1	1	1	0	1
LPL 447ter	1	0	0	0	1	1	0
PON1 met55	0	1	1	0	1	0	0
PON1 55leu	1	0	0	1	1	1	1
PON1 gln192	1	1	1	1	1	ND	1
PON1 192arg	1	0	0	1	1	ND	1
PON2 ser311	1	1	1	1	1	1	1
PON2 311cys	0	0	0	1	1	0	0
LDLR NcoI+	1	1	1	1	1	1	1
LDLR NcoI-	1	1	0	1	1	0	0
CETP CC	1	0	1	1	1	1	1
CETP CA	1	1	1	1	1	0	1
CETP AC	0	0	0	0	0	0	0
CETP AA	0	0	0	0	0	0	0
CETP ile405	1	1	1	1	0	1	1
CETP 405val	1	0	1	0	1	0	1
TNFb thr26	1	1	1	1	1	1	1
TNFb 26asn	1	0	0	0	0	0	0
CETP asp442	1	1	1	1	1	1	1
CETP 442gly	0	0	0	0	0	0	0
CETP G+	1	1	1	1	1	1	1
CETP A	0	0	0	0	0	0	0
Multiplex IIB	**Thp1**	**U937**	**HL60**	**HepG2**	**K562**	**Kyn2**	**Caco2**
CBS ile278	1	1	1	1	1	1	1
CBS 278thr	0	0	0	0	1	0	0
MTHFR C677	0	1	1	1	1	0	1
MTHFT 677T	1	0	1	1	0	1	0
NOS3 A-948	1	1	1	1	1	1	1
NOS3 G-948	0	0	1	1	1	0	0
NOS3 C-690	1	1	1	1	1	1	1
NOS3 -690T	0	0	0	0	0	0	0
NOS3 glu298	1	1	0	1	0	1	1
NOS3 298asp	0	0	1	1	1	0	0
ACE I	1	1	1	0	1	1	0
ACE D	1	1	1	1	1	0	1

Multiplex IIB (suite)	Thp1	U937	HL60	HepG2	K562	Kyn2	Caco2
AT1R A1166	1	1	1	1	1	1	1
AT1R 1166C	0	0	0	1	0	0	1
AGT met235	0	1	1	0	1	0	0
AGT 235thr	1	0	1	1	1	1	1
ANP val7	0	1	1	1	1	1	1
ANP 7met	1	0	0	0	0	0	0
ANP T2238	1	1	1	1	1	1	1
ANP 2238C	0	0	0	1	0	0	0
aADD gly460	0	0	1	1	1	0	1
aADD 460trp	1	1	0	0	1	1	0
ENaCa trp493	1	1	1	1	1	1	1
ENaCa 493arg	0	0	0	0	0	0	0
ENaCa thr663	0	1	1	1	1	1	1
ENaCa 663ala	1	0	0	1	0	0	0
GNB3 C825	0	1	1	1	1	0	1
GNB 825T	1	1	1	0	0	1	1
ADRB2 arg16	1	0	0	0	0	1	0
ADRB2 16gly	0	1	1	1	1	1	1
ADRB2 gln27	1	0	1	0	0	1	0
ADRB2 27glu	0	1	1	1	1	0	1
MMP3 5A	1	1	1	1	1	0	1
MMP3 A6	1	1	0	1	1	1	0
FII G20210	1	1	1	1	1	1	1
FII 20210A	0	0	0	0	0	0	0
FV arg506	1	1	1	1	1	1	1
FV 506gln	0	0	0	0	0	0	0
FVII -323del	1	1	1	1	1	1	1
FVII ins-323	0	0	0	0	0	0	0
FVII arg353	1	1	1	1	1	1	1
FVII 353glu	0	0	0	0	0	0	0
PAI1 5G	1	1	1	1	0	ND	1
PAI1 G4	0	0	0	0	1	ND	1
PAI1 G11053	0	0	0	0	1	1	1
PAI1 11053T	1	1	1	1	1	1	1
fibrinogen G-455	1	1	1	1	1	1	1
fibrinogen -455A	0	0	0	1	0	0	0
GP1a G873	0	0	1	0	1	1	1
GP1a 873A	1	1	0	1	0	0	0

Multiplex IIB (suite)	Thp1	U937	HL60	HepG2	K562	Kyn2	Caco2
GPIIIa leu33	1	1	1	1	1	1	1
GPIIIa 33pro	0	0	0	0	1	0	1
elam ser128	1	1	1	1	1	1	1
elam 128arg	0	0	0	0	0	0	0
elam leu554	1	1	1	1	1	1	1
elam 554phe	0	0	0	0	0	0	0
ICAM1 gly214	1	1	1	1	1	1	1
ICAM1 214arg	0	0	0	0	0	0	0
TNFa G-376	1	1	1	1	0	1	1
TNFa -376A	0	0	0	0	1	0	0
TNFa G-308	1	1	1	1	1	1	1
TNFa -308A	0	0	0	0	0	0	0
TNFa G-244/G-238	1	1	0	1	0	1	1
TNFa G-244/-238A	0	0	1	0	1	0	0
TNFa -244A/G-238	0	0	0	0	0	0	0
TNFa -244A/-238A	0	0	0	0	0	0	0
TNFb thr26	1	1	1	1	1	1	1
TNFb 26asn	1	0	0	0	0	0	0
Multiplex III	**Thp1**	**U937**	**HL60**	**HepG2**	**K562**	**Kyn2**	**Caco2**
IL4 (-589) C	0	1	1	1	1	1	1
IL4 (-589) T	1	0	0	1	0	1	0
IL4R 50 I	0	1	1	1	1	0	1
IL4 50 V	1	0	0	1	0	1	1
IL4 478S	1	1	1	1	1	1	1
IL4 478P	0	1	0	1	0	0	0
IL4 576Q	1	1	1	0	1	1	1
IL4 576R	1	1	0	1	0	0	1
IL13 (intron 3) C	1	1	1	1	1	1	1
IL13 (intron 3) T	0	0	0	1	0	1	0
ADRB2 16R	1	0	0	0	0	1	0
ADRB2 16G	0	1	1	1	1	1	1
ADRB2 27Q	1	0	1	0	0	1	0
ADRB2 27E	0	1	1	1	1	0	1
ADRB2 164T	1	1	1	1	1	1	1
ADRB2 164I	0	0	0	0	0	0	0
ICAM1 56K	1	1	1	1	1	1	1
ICAM1 56M	0	0	0	0	0	0	0

Multiplex III	Thp1	U937	HL60	HepG2	K562	Kyn2	Caco2
ICAM1 241G	1	1	1	1	1	1	1
ICAM1 241R	0	0	0	0	0	0	0
VCAM1 (-1594) T	1	1	1	1	1	1	1
VCAM1 (-1594) C	0	0	0	1	1	1	0
SELE 149S	1	1	1	1	1	1	1
SELE 149R	0	0	0	0	0	0	0
SELP 330S	1	1	1	1	1	1	1
SELP 330N	1	0	1	0	1	1	0
SELP 640V	1	1	1	1	1	1	0
SELP 640L	0	0	0	0	0	0	1
FCER1B 237E	1	1	1	1	1	1	1
FCER1B 237G	0	0	0	0	0	0	0
CD14 (-260) C	0	1	1	1	1	1	0
CD14 (-260) T	1	0	1	1	1	0	1
UGB (+38) G	1	1	0	1	1	1	1
UGB (+38) A	0	1	1	0	1	1	0
TGFB1 (-509) C	1	1	1	1	1	1	1
TGFB1 (-509) T	1	0	0	0	0	0	0
SCYA11 23A	1	1	1	1	1	1	1
SCYA11 23T	1	0	1	1	0	0	1
CCR2 62V	1	1	1	1	1	1	1
CCR2 62I	1	0	1	1	0	1	0
CCR3 39P	1	1	1	1	1	1	1
CCR3 39L	0	0	0	0	0	0	0
CCR5 wt	1	1	1	1	1	1	1
CCR5 deletion 32	0	0	0	0	0	0	0
CCR5 (promoter) G	1	1	0	1	0	1	1
CCR5 (promoter) A	1	0	1	1	1	1	1
TCF7 19P	1	1	1	1	1	1	1
TCF7 19T	0	0	0	0	0	0	0
IL9 113T	1	1	1	1	1	1	1
IL9 113M	0	0	0	1	1	0	0
IL1A (-889) T	0	1	1	1	0	0	1
IL1A (-889) C	1	1	1	1	1	1	0
IL1B 105F 4336C	1	1	1	1	1	1	0
IL1B105F 4336T	0	1	1	1	0	0	1
IL5RA (-80) G	1	0	1	1	1	1	1
IL5RA (-80) A	0	1	1	0	0	1	0

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

Multiplex III	Thp1	U937	HL60	HepG2	K562	Kyn2	Caco2
IL6 (-572) G	0	1	1	1	1	0	1
IL6 (-572) C	1	0	0	0	0	1	0
IL6 (-174) G	1	ND	0	1	1	1	1
IL6 (-174) C	0	ND	1	0	1	0	1
IL10 (-571) C	0	1	1	1	1	1	1
IL10 (-571) A	1	0	1	1	0	1	0
C3 102R	1	1	1	1	1	1	1
C3 102G	0	0	0	1	0	0	0
C5 802I	1	1	1	1	1	1	1
C5 802V	0	1	1	0	0	0	1
CSF2 117I	0	ND	1	1	1	1	1
CSF2 117T	1	ND	0	0	0	0	0
CTLA4 (-318) C	1	1	1	1	1	1	1
CTLA4 (-318) A	0	0	0	0	0	0	0
CTLA4 17T	0	0	1	1	0	0	1
CTLA4 17A	1	1	1	1	1	1	1
LTC4S (-444) A	1	1	1	1	1	1	1
LTC4S (-444) C	1	0	1	1	0	0	0
NOS2A 346D 231T	1	1	1	1	1	1	1
NOS2A 346D 231C	0	1	0	0	0	0	0
NOS3 (-948) A	1	1	1	1	1	1	1
NOS3 (-948) G	0	0	1	1	1	0	0
NOS3 298E	1	1	0	1	0	1	1
NOS3 298D	0	0	1	1	1	0	0
SCYA11 (-1328)G	1	1	1	1	0	1	1
SCYA11(-1328)A	0	0	0	1	1	0	1
SDF1 (3' UTR) G	1	1	1	1	1	1	1
SDF1 (3' UTR) A	0	0	1	1	0	1	0
LTA (intron A) A	1	1	1	1	1	1	1
LTA (intron A) G	1	0	0	0	0	0	0
TNF (-308) G	1	1	1	1	1	1	1
TNF (-308) A	0	0	0	0	0	0	0
TNF (-238) G	1	1	0	1	0	1	1
TNF (-238) A	0	0	1	0	1	0	0
VDR 1M	0	1	1	0	1	0	1
VDR 1T	1	0	1	1	0	1	0
GC 416D, 420K	0	1	1	0	1	1	0
GC 416D, 420T	1	0	0	1	0	0	0
GC 416E, 420T	1	0	1	1	1	0	1

BIBLIOTHEQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

N° d'identification : 207

TITRE

Profils génétiques de lignées cellulaires humaines modèles en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardio-vasculaires

Thèse soutenue le 03 octobre 2007

Par Elise JEANNESSON

RESUME :

Background. Nowadays, it is well known that genetic polymorphisms can modulate the expression of genes involved in the different biological pathways of a given organism. It is particularly true for the cardiovascular system where polymorphisms can directly influence the production of metabolic mediators, such as cholesterol, or the response to drugs used for the treatment of cardiovascular diseases. In addition, human cell lines are currently used as *in* vitro models to study biochemical mechanisms or to monitor drug effect. The existing polymorphisms in these cells still remain to be determined.

Objectives. We attempted to analyze genetic profiles of 7 human cell lines for several genes implicated in different cardiovascular pathways. This work may constitute a useful data bank allowing researchers to choose the most appropriate cell line for a given experiment. In addition, it will highlight if each cell line does carry polymorphisms which may influence *in vitro* studies or that could partly explain contradictions observed between *in vitro* and *in vivo* approaches.

Methods. The commonly used human Thp1, U937, HepG2, HL60, K562, Kyn2 and Caco2 cell lines were genotyped for 120 polymorphisms in 68 genes involved in inflammation, cellular adhesion, lipid metabolism, blood pressure regulation, coagulation and other pathways related to the cardiovascular system. Three techniques were applied including a multiplex PCR-colorimetric detection assay, PCR-RFLP and assays based on the TaqMan technology.

Results and discussion. We showed that the cell lines carry numerous polymorphisms of genes involved either in the initiation and the development of cardiovascular pathologies or in the drug treatment response. For example, concerning the inflammation process, data indicate that Thp1 cells are homozygotes for mutated alleles, which are associated with higher cardiovascular risk, at positions C-571A in *IL10* and G-572C in *IL6* genes. By contrast, U937 cells are homozygotes for wild type allele at both positions. For blood pressure regulation, deletion in intron 16 of the *ACE* gene, known to be associated with lower ACE concentration and susceptibility to several cardiovascular pathologies, is found in all cell lines except Kyn2 cells. In addition, a potential application of our work is illustrated by the results obtained for the lipid pathway. Lipid homeostasis and hypolipemic treatment outcome are influenced by numerous polymorphisms such as those in *APOE*. U937 cell line is the only one that expresses apoliporotein E4 isoform and is thus an interesting model.
As a conclusion, our data suggest that these cell lines represent attractive and convenient *in vitro* models in the fields of cardiovascular physiopathology and pharmacotoxicology. They will contribute to a better understanding of the drug action mechanism or may lead to the discovery of new therapeutic targets.

MOTS CLES : Cell line, genetic profile, cardiovascular system, physiopathology, pharmacotoxicology

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr Gérard Siest	**Equipe INSERM « Génétique Cardio-vasculaire » du CIC 9501**	**Expérimentale** ☒ **Bibliographique** ☐ **Thème** 5

Thèmes
1 – Sciences fondamentales
2 – Hygiène/Environnement
3 – Médicament
4 – Alimentation – Nutrition
5 - Biologie
6 – Pratique professionnelle