Études fonctionnelles et structurales des mutants du gène CYP21A2 dans l'hyperplasie congénitale des surrénales

Rita El Medawar Menassa

▶ **To cite this version:**

Rita El Medawar Menassa. Études fonctionnelles et structurales des mutants du gène CYP21A2 dans l'hyperplasie congénitale des surrénales. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10160 . tel-00699819

HAL Id: tel-00699819

https://theses.hal.science/tel-00699819

Submitted on 21 May 2012

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.

N° d'ordre 160-2009 Année 2009

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 02 Novembre 2009

par

Rita EL MEDAWAR-MENASSA

Etudes fonctionnelles et structurales des mutants du gène *CYP21A2* dans l'hyperplasie congénitale des surrénales

Directeur de thèse : Professeur Yves MOREL

JURY :	Professeur Jacques YOUNG	Rapporteur
	Docteur Christa FLÜCK	Rapporteur
	Docteur Martine BEGEOT	Examinateur
	Docteur Jacques CHOMILIER	Examinateur
	Docteur Véronique TARDY	Co-encadrante de thèse
	Professeur Yves MOREL	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université	**M. le Professeur L. COLLET**
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J.F. MORNEX
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur J. LIETO
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. SIMON
Secrétaire Général	M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur P. COCHAT
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. O. ROBIN
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur MATILLON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique	Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur H. PINON
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur G. CLERC
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
UFR STAPS	Directeur : M. C. COLLIGNON
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J. LIETO
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
IUT B	Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

REMERCIEMENTS

Depuis le collège et quand quelqu'un me demandait ce que je voulais faire « quand je serai grande », je répondais que j'aurais bien aimé être pharmacienne, puis chercheuse pour découvrir de nouveaux médicaments… et ceci bien sûr en France, le pays toujours considéré comme la « mère affectueuse » du Liban..
Arrivée au brevet j'ai essayé d'avoir de bonnes notes pour pouvoir suivre le bac français, puis à la fac, après avoir réussi le concours de pharmacie, de très bonnes notes étaient requises pour avoir une bourse et aller faire la sixième année de pharmacie en France !!!
Arrivée à Lyon, le milieu hospitalier m'a tout de suite attirée et j'ai senti que j'étais faite pour travailler dans ce cadre là plutôt que de monter ma propre officine ; mes parents étant d'accord, j'ai fait mon choix et à partir de là un premier pas vers le troisième cycle…
Dés la deuxième année en France, j'ai intégré le laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares pour démarrer la mise au point des études fonctionnelles, avec l'aide des gens de plusieurs disciplines, que je tiens particulièrement à remercier:

Mon directeur de thèse, le Professeur Yves MOREL, que je remercie pour m'avoir proposé ce vaste travail, riche et passionnant. Sa confiance m'a encouragée à le réaliser. J'ai pu pendant ces dernières années profiter de son expérience scientifique très enrichissante. J'espère qu'on pourra transmettre toute la richesse du laboratoire dans les années à venir.

Ma co-encadrante de thèse, le Docteur Véronique TARDY, je ne serais jamais assez reconnaissante pour ta confiance, ton aide, ton réconfort et ton encouragement autant sur le plan professionnel que personnel. Plus qu'une encadrante, tu as été pour moi un vrai support, toujours à mes côtés pour tout m'apprendre. Il reste encore tellement de choses à faire, j'espère que je serais toujours à la hauteur de ta confiance ….

Nos juges,

Monsieur le Professeur Jacques YOUNG et Madame le Docteur Christa FLÜCK qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de cette thèse. Je voudrais leur exprimer ma respectueuse considération et les remercier pour leurs précieux conseils.

Madame le docteur Martine BEGEOT pour avoir accepté de juger mon travail et surtout pour avoir pris le temps de me guider dans l'apprentissage des études fonctionnelles. Nous la prions de croire en notre profond respect.

Monsieur le docteur Jacques CHOMILIER pour l'apprentissage des nouvelles techniques de bioinformatique, précieuses pour démarrer les études structurales sur ce gène. Sa présence dans la thèse nous a paru très enrichissante.

Je souhaite bien sûr remercier tous les membres de l'équipe, qui m'ont formée et supportée …
Delphine qui m'a beaucoup aidé à me lancer dans les techniques de mutagenèse dirigée, elle était toujours à mon écoute pour tous les problèmes rencontrés. Sans elle, il aurait été encore plus difficile de mettre au point ces études fonctionnelles
Laurence, pour son écoute et son soutien dans les moments difficiles
Ingrid, pour ses conseils
Faïza pour ses conseils au point de vue personnel, et surtout son aide dans la collaboration scientifique avec le Liban,
Muriel, Maryline, Audrey, Françoise, Claude, Laurence et Carole pour leur aide et leur soutien.

Jacqueline, merci encore pour ces fameux dosages qui m'ont permis de boucler les manips de transfection
Marie-Pierre et Christiane, pour leurs conseils d'experts sur l'extraction des stéroïdes.

Alexandra, ange et coordinatrice du laboratoire, sans son sourire et son humeur de petit ange il était impossible de surmonter les moments difficiles, plus qu'une amie elle sait bien que c'est un membre de la famille Menassa.

Je remercie également tous les cliniciens sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisable
Je remercie la région Rhône-Alpes, grâce à son financement, j'ai pu venir en France et démarrer ma thèse de sciences.

A tous mes amis, Thierry, Marc, Pascalou, Nada, Nancy, Rita, Ghina et David, merci pour tous vos conseils et surtout les fameux repas de midi, le petit souffle de la journée….
J'espère que les neurones perdus durant la grossesse ne pénaliseront pas la soutenance pik, pik, pik...

Charles et Degaule, leur présence à mes côtés a été et sera toujours indispensable ! Alors mes chouchous, c'est la dernière ligne droite avant les nuits blanches…. La petite, Clara, Marianne, Sandra… arrive bientôt !!!

Mes parents, je ne serai jamais assez reconnaissante pour leur aide, réconfort, encouragements, et surtout merci d'avoir toujours supporté mes choix sans jamais me dissuader, sachez bien que je ne serai pas là sans vous…

Mes sœurs, merci infiniment pour votre présence continue, sachez bien que la distance qui nous sépare ne pourra jamais toucher à notre relation fusionnelle !!!!

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS

AVANT PROPOS

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Stéroïdogenèse surrénalienne....14
1. Enzymes de la stéroïdogenèse surrénalienne....14
1.1. Les cytochromes P450 15
1.2. Hydroxystéroïdes déshydrogénases ou oxydoréductases 16
2. Réactions enzymatiques....17
2.1. Etapes préliminaires non enzymatiques : capture, stockage et transport du cholestérol 17
2.2. Enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse surrénalienne.... 18
2.3. Voie de biosynthèse surrénalienne.... 19
3. Catabolisme des stéroïdes....20
4. Mode d'action des hormones stéroïdes....20
II. Structure 3D des cytochromes P450....21
1. Généralités 21
2. Structure générale et mécanisme d'action des cytochromes P450 microsomiaux 23
2.1. Structure générale 23
2.2. Mécanisme d'action 24
3. Architecture tridimensionnelle des cytochromes microsomiaux....28
4. Différents domaines d'un cytochrome P450 microsomal....30
4.1. Domaine d'ancrage à la membrane.... 30
4.2. Domaine de liaison à l'hème.... 30
4.3. «Meander» et ERR triade.... 32
4.4. Site actif : Liaison du substrat et catalyse.... 33
4.5. Liaison aux partenaires d'oxydo-réduction 37
III. Hyperplasie congénitale des surrénales 41
1. Le déficit en 21-hydroxylase 41
1.1. Physiopathologie.... 42
1.2. Epidémiologie.... 42
1.3. Les formes cliniques et leur diagnostic.... 42
2. Le déficit en 11β-hydroxylase 45
2.1. Physiopathologie.... 45
2.2. Clinique.... 46
2.3. Biologie.... 47
2.4. Etude moléculaire 47
IV. Gènes associés au déficit en 21-hydroxylase....48
1. Caractéristiques des gènes de la 21-hydroxylase....48
2. Organisation du locus de la 21-hydroxylase....48
V. Lésions des gènes CYP21 décrites dans la littérature....49
1. Larges lésions....49
1.1. Délétions et larges conversions géniques 49
1.2. Duplications.... 50
2. Mutations ponctuelles....50
2.1. Mutations situées dans les parties codantes du gène 50
2.2. Mutations ponctuelles situées dans les introns 53

3. Association de plusieurs mutations dérivées du pseudogène 53
4. Mutations plus rares décrites dans la littérature.....54

MATERIEL ET METHODES

I. Etude moléculaire des patients 59
1. Préparation des échantillons 59
2. Amplification du gène *CYP21A2*.....59
2.1. Principe de la technique..... 59
2.2. Conditions d'amplification 60
2.3. Vérification et purification des produits PCR..... 61
3. Séquençage automatique.....62
3.1. Principe de la technique..... 62
3.2. Amorces utilisées dans la réaction de séquence 62
3.3. Conditions de séquençage..... 63
II. Etude fonctionnelle du CYP21.....64
1. Fabrication des mutants par mutagenèse dirigée 64
1.1. Introduction de la mutation par PCR 64
1.2. Réaction de transformation..... 68
1.3. Sélection des clones contenant le plasmide d'intérêt..... 69
1.4. Préparation du plasmide d'intérêt..... 70
2. Expression des protéines mutantes dans les cellules COS1 et détermination de leur activité enzymatique 71
2.1. Culture des cellules COS1 71
2.2. Transfection des cellules COS1..... 72
2.3. Détermination de l'activité enzymatique..... 73
2.4. Détermination des constantes cinétiques 75
2.5. Quantification des protéines totales..... 76
2.6. Dosage de la hGH 77
2.7. Analyse de l'expression protéique par Western Blot..... 77
III. Etudes structurales des cytochromes CYP21, POR et CYP11B1.....79
1. Construction du modèle par homologie.....80
1.1. Identification des « templates » avec une structure 3D connue..... 80
1.2. Alignement structural des « templates »..... 81
1.3. Edition des résultats avec le logiciel GENEDOC..... 81
1.4. Prédiction des structures secondaires..... 81
1.5. Construction du modèle 3D 81
1.6. Validation du modèle 3D..... 83
2. Exploitation du modèle.....87
2.1. Identification des résidus impliqués dans les différents domaines 87
2.2. Paramètres analysés pour la prédiction des mutations..... 88
3. Etude de l'interaction ou « Docking » entre CYP21 et POR.....89
4. Autres outils prédictifs utilisés pour l'analyse des mutations :.....89
« Alamut » - « SIFT » - « Polyphen ».....89

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Données cliniques et biologiques des patients avec une mutation rare.....91
1. Patients atteints de forme classique 92

1.1. Bilan des données cliniques 92
1.2. Bilan des données biologiques 93
2. Patients avec une forme non classique 101
2.1. Bilan des données cliniques 101
2.2. Bilan des données biologiques 101
3. Patients atteints d'une forme difficile à classer d'après le phénotype. 108
4. Simples hétérozygotes 108
4.1. Critères diagnostiques des hétérozygotes étudiés 108
4.2. Résultats 109
II. Mutations rares identifiées chez les patients 112
1. Mutations dont la sévérité peut être déduite de leur nature 112
1.1. Mutations non-sens ou responsables d'un décalage du cadre de lecture 112
1.2. Délétions particulières 113
2. Mutations faux-sens 113
2.1. Mutations faux-sens dont la sévérité a été publiée dans la littérature 114
2.2. Mutations dont la sévérité a été déduite du phénotype des patients 120
III. Etude *in vitro* de 14 mutations rares 126
1. Analyse comparative des mutants par rapport à la protéine normale 126
1.1. Validation des études *in vitro* 126
1.2. Résultats 128
2. Etude cinétique avec résultats des constantes de Michaelis-Menten Km et Vmax 132
2.1. Mise au point 132
2.2. Calcul des constantes cinétiques des différents mutants 133
3. Analyse par Western Blot : 137
IV. Modélisation par homologie du CYP21 : construction du modèle et études *in silico* des nouvelles mutations 138
1. Choix du « template » 139
2. Construction du modèle CYP21 139
2.1. Alignement des structures primaires des différentes familles de cytochromes P450 139
2.2. Construction du modèle tridimensionnel du CYP21 140
2.3. Exploitation du modèle : analyse des domaines spécifiques 145
3. Utilisation du modèle pour étudier la conséquence des mutations 153
3.1. Etude *in silico* des mutations testées *in vitro* 154
3.2. Etude *in silico* des mutations dont la sévérité a été déduite du phénotype 163
3.3. Mutation dont la sévérité est prédite par les seules études *in silico* 171
V. Traitement structure-fonction 182
1. Architecture du site actif et liaison au substrat 183
2. Site actif : Interprétation des données expérimentales 184
3. Réaction d'oxydo-réduction 184
4. Stabilité de la protéine 185
5. Limites de la modélisation par homologie 185
VI. Relation CYP21-POR 186
VII. Construction du modèle CYP11B1 186
1. Alignement des structures primaires des différentes familles de cytochromes P450 186
2. Modèle tridimensionnel du CYP11B1 187

<u>Article 1</u> : p.H62L, a Rare Mutation of the CYP21 Gene Identified in Two Forms of 21-Hydroxylase Deficiency

Article 2 : Phenotype-Genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier

Article 3 : Three Novels CYP 11B1 mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia due to Steroid 11ß-Hydroxylase deficiency in Moroccan population

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES……..... 192

BIBLIOGRAPHIE…….194

LISTE DES ABREVIATIONS

ACTH : adrénocorticotrophine *(Adrenocorticotropic Hormone)*
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AC : âge chronologique
AO : avance de l'âge osseux ; AS : avance staturale
ARNm : acide ribonucléique messager
ARP : activité rénine plasmatique

Composé S : 11-désoxycortisol
CCM : chromatographie sur couche mince
CYP : cytochrome

dNTP : désoxyribonucléotides
dDNTP : di-désoxyribonucléotides
DOC : 11-désoxycorticostérone
DPN : diagnostic prénatal
DNN : diagnostic néonatal

EDTA : *Ethylene Diamine Tetraacetic acid*

FAD : *Flavine Adénine Dinucléotide*
FMN : *Flavine mononucléotide*
FC : forme classique ; FNC : forme non classique

HTZ : hétérozygote

KDa : kilo Dalton

NADPH : *Nicotinamide Adenine Nucleotide phosphate*

OGE : organes génitaux externes
17-OHP : 17-hydroxyprogestérone

Pb : paire de bases

PBS : tampon phosphate (phosphate buffer saline)

PSB : perte de sel biologique

PSC : perte de sel clinique

PCR : réaction de polymérisation en chaîne *(Polymerase Chain Reaction)*

POR : P450 oxydoréductase

PP : pilosité pubienne

PPP : pseudo-puberté précoce

P : progestérone

Rpm : rotations par minute

StAR : *Steroidogenic Acute Regulatory Protein*

SVF : sérum de veau fœtal

SW : forme classique avec perte de sel clinique

SV : forme virilisante pure

WT : type sauvage (*Wild type*), plasmide contenant l'ADNc normal

AVANT PROPOS

L'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS) est une maladie autosomique récessive due à un déficit en 21-hydroxylase dans environ 95 % des cas. Ce déficit enzymatique est responsable d'une diminution de synthèse du cortisol conduisant à une levée du rétrocontrôle négatif sur l'ACTH antéhypophysaire avec hyperplasie bilatérale des surrénales et augmentation de synthèse des androgènes surrénaliens, notamment de la Δ4-androstènedione qui est convertie en périphérie en testostérone. La diminution de la synthèse de l'aldostérone dans la zone glomérulée entraîne une activation du système rénine-angiotensine.

Ce déficit enzymatique se manifeste par deux formes cliniques : la forme classique (environ une naissance sur 15000) (Pang et al., 1988) avec perte de sel clinique ou sans perte de sel clinique dite forme virilisante pure et forme non classique de fréquence encore indéterminée.

Les gènes associés au déficit en 21-hydroxylase sont connus depuis une vingtaine d'années (Higashi et al., 1988) et ils sont localisés sur le bras court du chromosome 6 dans une région dupliquée englobant les gènes codant pour la fraction C4 du complément et ceux de la tenascine. Le gène qui code pour le cytochrome CYP21 est le gène *CYP21A2* tandis qu'existe un pseudogène *CYP21A1P*, non fonctionnel, homologue à 98 % au *CYP21A2* et réservoir des mutations les plus fréquemment identifiées chez les patients.

Les corrélations entre le génotype et le phénotype dans ce déficit ont été largement étudiées dans plusieurs populations différentes (Speiser et al., 1992), (Higashi and Fujii-Kuriyama, 1991), (Mornet et al., 1991), (Owerbach et al., 1990), (Wedell et al., 1994), (Wilson et al., 1995) et il a été bien établi que le phénotype est déterminé par l'allèle portant la mutation la moins sévère. Les mutations identifiées au niveau du gène *CYP21A2* peuvent être groupées en trois catégories suivant l'activité enzymatique résiduelle déduite des études *in vitro* (Higashi and Fujii-Kuriyama, 1991), (Higashi et al., 1988), (Tusie-Luna et al., 1990), (Tusie-Luna et al., 1991) :

1) mutations nulles, associées à la forme classique avec perte de sel clinique,

2) mutations comme la p.I172N laissant persister une faible activité enzymatique suffisante pour empêcher la perte de sel clinique à la naissance

3) mutations du même type que la p.V281L (Speiser and New, 1987) et p.P453S avec une activité enzymatique résiduelle de 20 à 70%, associées à la forme non classique.

Le screening dans notre laboratoire de plus de 4500 allèles du gène *CYP21A2* a permis l'identification d'environ 107 nouvelles mutations (6% d'allèles), et même si le nombre de malades avec la même mutation permet de déduire la sévérité de leur phénotype, les études

fonctionnelles *in vitro* devraient être exigées pour confirmer la bonne corrélation génotype-phénotype et proposer un conseil génétique correct aux familles.

En effet, un diagnostic prénatal et un traitement prénatal devront être proposés aux couples à risque d'avoir un enfant avec une forme classique, donc une petite fille avec une ambiguïté sexuelle (Forest et al., 1998), (Pinto et al., 2003) :

1) les couples avec un premier enfant atteint de forme classique

2) les patients avec une forme classique et dont le conjoint est porteur d'une mutation sévère

3) les sujets porteurs d'une mutation sévère sur un des deux allèles (60 % des formes non classiques, apparentés) et dont le conjoint est porteur d'une mutation sévère.

CYP21 est le cytochrome pour lequel le plus grand nombre de substitutions d'acides aminés (mutations et polymorphismes) a été décrit. Des outils bioinformatiques ont été ainsi développés afin de mieux comprendre la relation structure–fonction du CYP21 et par conséquent de toute la famille de cytochromes P450.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Stéroïdogenèse surrénalienne

La stéroïdogenèse surrénalienne se déroule au niveau de la corticosurrénale. Cette dernière représente 80% de la surrénale. Elle est structurée en 3 zones. La zone la plus externe est appelée glomérulée ; elle est située directement sous la capsule et constituée de cordons de grandes cellules. La zone fasciculée est située au milieu et la réticulée est proche de la médullaire. Ces trois zones constituent 15%, 75% et 10% du cortex surrénalien respectivement chez l'adolescent et l'adulte (Miller, 2005a). La zone fasciculée contient des colonnes cellulaires entrelacées dans la zone réticulée. Ces deux dernières zones peuvent régénérer à partir des cellules de la zone glomérulée.

1. Enzymes de la stéroïdogenèse surrénalienne

Avant de décrire les différentes enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse surrénalienne, il est nécessaire de faire le point sur une nomenclature en pleine évolution (tableau 1) :

TABLEAU 1 : Nomenclature des enzymes de la stéroïdogenèse surrénalienne

Gène	Protéine	Activité	Localisation tissulaire	Localisation cellulaire
CYP11A1	CYP11A1 (=P450scc)	22-hydroxylase, 20α-hydroxylase et 20,22 desmolase	Surrénale et gonade	mitochondrie
CYP17A1	CYP17 (=P450c17)	17α-hydroxylase et 17,20 lyase	Surrénale et gonade	cytosol
CYP21A2	CYP21 (=P450c21)	21-hydroxylase	Surrénale	cytosol
CYP11B1	CYP11B1 (=P450c11β)	11ß-hydroxylase 18-hydroxylase (+/-)	Surrénale	mitochondrie
CYP11B2	CYP11B2 (=P450c11AS)	11ß-hydroxylase 18-hydroxylase 18-déshydrogénase	Surrénale	mitochondrie
HSD3B2	HSD3B2 (=3ß-HSD)	3 ß-hydroxystéroïde-déshydrogénase	Surrénale et gonade	cytosol

Pour chaque étape de la biosynthèse des stéroïdes et comme pour toute réaction enzymatique, il est nécessaire de connaître :

1. le complexe enzymatique formé de protéines, de co-enzymes qui sont des molécules non-protéiques souvent dérivées de vitamines (NADH, FAD) et des ions comme l'ion ferreux et l'ion ferrique ;

2. les substrats qui sont transformés par la réaction enzymatique ;
3. les produits qui résultent de la transformation du substrat par l'enzyme ;
4. la localisation de la réaction (cytosolique ou mitochondriale tissulaire)

Deux familles d'enzymes sont impliqués dans la stéroïdogenèse surrénalienne : les cytochromes P450 et les hydroxystéroïdes déshydrogénases (ou oxydoréductases).

1.1. Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYPs) forment une superfamille d'hémoprotéines (Gonzalez, 1988) responsables du métabolisme oxydatif d'une large variété de composés xénobiotiques comme les médicaments et les carcinogènes ainsi que les composés comme les stéroïdes, prostaglandines ou acides gras.

Ils ont tous en commun un thiolate comme ligand axial du fer au centre de l'hème. Le nom « P450 » est dû aux propriétés de ce chromophore (ressemblant au chlorohylle à hème des végétaux d'où le nom Pigment). En 1963, deux chercheurs japonais, Sato et Omura, ont appellé « pigment 450 » le composé responsable du pic d'absorbance à 450 nm qui apparaît quand on sature en monoxyde de carbone une préparation subcellulaire de glandes surrénales par le sodium dithionite (Omura and Sato, 1964).

Les P450s eucaryotes sont des protéines membranaires microsomales intrinsèques qui sont exprimées chez plusieurs espèces ; plantes, champignons ou cellules animales. Ces dernières expriment aussi des cytochromes P450 qui se situent au niveau de la membrane interne de la mitochondrie.

Nelson et al. (Nelson et al., 1996) recensaient en 1995, 481 gènes codant pour des CYPs et 22 pseudogènes. Ces gènes ont été décrits chez 85 eucaryotes, incluant vertébrés, invertébrés, plantes et algues et 20 procaryotes. De nombreux autres cytochromes P450 ont été isolés depuis et plus de 1000 sont aujourd'hui clairement identifiés. Depuis 1987, ces protéines sont répertoriées et désignées selon une nomenclature basée uniquement sur le pourcentage d'homologie entre les séquences en acides aminés (Nebert et al., 1987), les similitudes en terme d'activité enzymatique et de régulation ne sont pas prises en compte (Nelson et al., 1993). Ainsi, deux P450s appartiennent à la même famille lorsque leurs séquences en acides aminés présentent une homologie supérieure à 40%. Si l'homologie est supérieure à 55% les protéines font partie de la même sous-famille. Les protéines ayant moins de 3% de divergence sont classées comme variants alléliques.

La masse moléculaire des CYPs est comprise entre 43 et 60 kDa, possédant un noyau tétrapyrollique qui complexe un atome de fer pouvant passer de l'état ferreux (Fe2+) à l'état ferrique (Fe3+) de manière réversible, ce qui leur confère des propriétés d'oxydo-réduction.

Les CYPs impliqués dans la stéroïdogenèse surrénalienne sont au nombre de 5 chez l'homme. Le cytochrome CYP11A1 (20-22 desmolase), situé dans les mitochondries surrénaliennes, catalyse le clivage de la chaîne latérale du cholestérol. Deux isoenzymes de la CYP11B, CYP11B1 et CYP11B2 retrouvées aussi dans la mitochondrie, catalysent les activités 11β-hydroxylase, 18-hydroxylase et 18 déshydrogénase (CYP11B1, CYP11B2). Les deux derniers cytochromes sont situés dans le réticulum endoplasmique (orientés vers le cytosol (figure 1), CYP17 catalysant les activités 17α-hydroxylase et 17,20- lyase et CYP21 l'activité 21-hydroxylase.

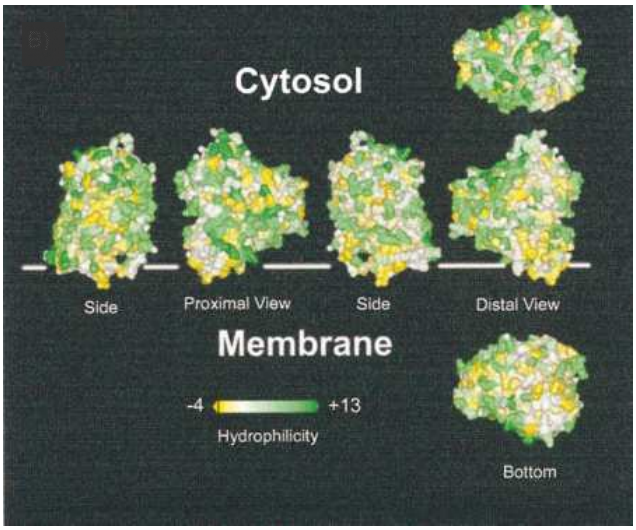


FIGURE 1 : Association à la membrane des cytochromes microsomiaux (*D'après Williams, Molecular Cell, 2000)*

1.2. Hydroxystéroïdes déshydrogénases ou oxydoréductases

La deuxième classe d'enzymes stéroïdogènes est appelée hydroxystéroïdes déhydrogénases (HSDs) (Penning, 1997). Elles ne contiennent pas de molécule d'hème. A la différence des réactions catalysées par les cytochromes P450 qui résultent de l'action d'une seule enzyme, les réactions catalysées par les HSDs peuvent être catalysées par au moins deux isoenzymes de HSDs. Parmi les membres de cette famille, on retrouve les différents types de 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase, 11β-hydroxystéroïdes déshydrogénases et 17β-hydroxystéroïdes déshydrogénases.Ces enzymes assurent la déshydrogénation, l'hydroxylation et l'isomérisation et/ou la réduction des doubles liaisons carbone-carbone, permettant ainsi l'interconversion entre différentes formes de stéroïdes.

2. Réactions enzymatiques

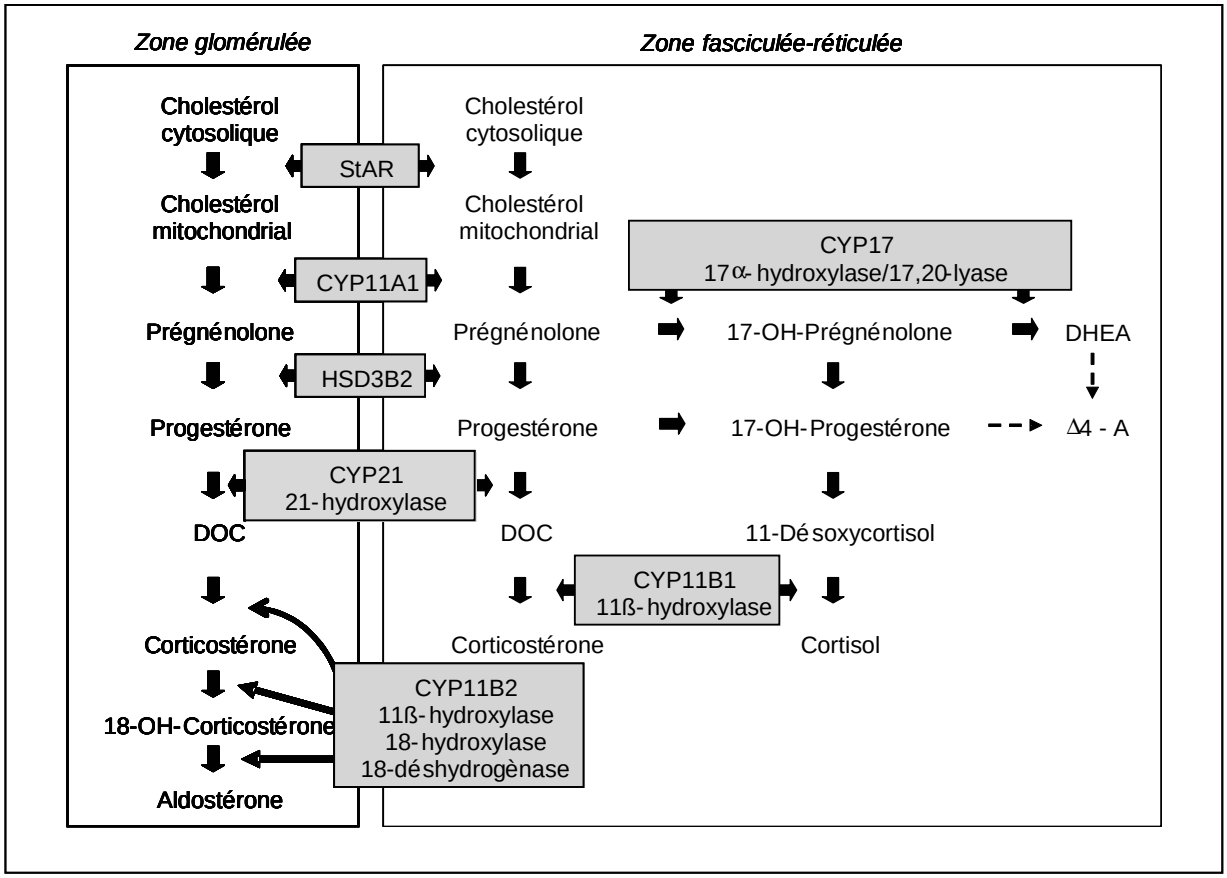


FIGURE 2 : La stéroïdogenèse surrénalienne chez l'homme

2.1. Etapes préliminaires non enzymatiques : capture, stockage et transport du cholestérol

Le facteur limitant dans la biosynthèse des stéroïdes est la quantité de cholestérol libre au niveau de la membrane externe de la mitochondrie des cellules du cortex surrénalien. L'origine du cholestérol libre est triple. La première est endogène à partir de l'acétyl co-enzyme A localisée dans le réticulum endoplasmique, la seconde est exogène à partir des LDL et de l'endocytose du récepteur des LDL ; La dernière source correspond aux gouttelettes liquides où le cholestérol est stocké sous forme d'esters. Le mécanisme de transport jusqu'à la membrane externe de la mitochondrie est encore mal connu. Plusieurs protéines, dont la protéine StAR (figure 2), ont été proposés comme transporteurs du cholestérol du cytosol à la mitochondrie (Bose et al., 1999). En revanche, celui permettant le transport de la membrane externe de la mitochondrie à la membrane interne a été extensivement étendu et implique la protéine StAR.

.

2.2. Enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse surrénalienne

- CYP11A1

Cette enzyme convertit le cholestérol en pregnénolone au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Cette conversion est un facteur limitant de la stéroïdogenèse. Elle implique trois réactions séquentielles : 22-hydroxylation, 20α-hydroxylation, et 20,22-desmolase/lyase responsable du clivage de la chaîne latérale du cholestérol pour former la prégnénolone et l'isocaproaldéhyde. Comme le 20-hydroxycholestérol, 22-hydroxycholestérol, et le 20,22 dihydroxycholestérol pouvaient être isolés de la surrénale bovine en quantité équivalente, il aurait été suggéré que cette étape était catalysée par trois enzymes différents. Enfin, une seule protéine codée par un seul gène sur le chromosome 15 (Lin et al., 1995), catalyse les premières étapes de la stéroïdogenèse entre le cholestérol et la prégnénolone (Chung et al., 1986b).

- HSD3B2

Cette enzyme catalyse à la fois l'oxydation de la fonction 3β-OH en 3-cétone et l'isomérisation de la double liaison des Δ5 en Δ4 (Thomas et al., 1989), (Luu The et al., 1989), (Lorence et al., 1990). Ainsi une même enzyme va convertir la prégnénolone en progestérone, la 17α-hydroxyprégnénolone en 17α-hydroxyprogestérone, déhydroépiandrostérone (DHEA) en androstènedione et l'androstènediol en testostérone. Il existe deux isoenzymes pour la 3β-HSD codées par deux gènes différents. La 3β-HSD type II est présente au niveau du cortex surrénalien et des gonades (Lachance et al., 1990), (Rheaume et al., 1991) et la 3β-HSD type I est présente dans le placenta, les seins et les tissus extra-glandulaires (Lachance et al., 1990), (Lorence et al., 1990).

- CYP17

Cette enzyme a une double activité 17α-hydroxylase et 17,20-lyase. Ce cytochrome se trouve au niveau du cortex surrénalien, dans les ovaires et les testicules mais pas dans le placenta (Voutilainen et al., 1986). L'activité 17α-hydroxylase est présente dans les deux zones fasciculées et réticulées (Reincke et al., 1998). Elle assure l'hydroxylation en position 17 de la prégnénolone et de la progestérone pour former la 17α-hydroxyprégnénolone (voie des stéroïdes Δ5) et la 17α- hydroxyprogestérone (17-OHP, voie des stéroïdes Δ4). L'activité 17,20 lyase du cytochrome CYP17 est exclusive à la zone réticulée. Elle permet la coupure de la liaison C17-C20 de ces dérivés en C21 17α-hydroxylés pour former les androgènes (C19), la déhydroépiandrostérone DHEA et la Δ4–Aandrostènedione (Δ4-A) (Nakajin and Hall, 1981). Le

CYP 17 est codé par un seul gène (*CYP17A1*) situé sur le chromosome 10q24.3 (Oprian and Coon, 1982), (Zhang et al., 1992).

- CYP21

Cette enzyme présente seulement au niveau du cortex surrénalien est responsable de l'hydroxylation en position 21 de la progestérone et de la 17-OHP pour former la désoxycorticostérone (voie des minéralocorticoïdes) et le 11-désoxycortisol (voie des glucocorticoïdes) respectivement (Sasano et al., 1988), (Kominami et al., 1980). Le CYP21 est codé par un seul gène *CYP21A2* sur le chromosome 6p21 (Higashi et al., 1986),(Rodrigues et al., 1987), (White et al., 1986) .

- CYP11B1 et CYP11B2

Ces deux enzymes mitochondriales ont 93% d'homologie de séquence en acides aminés (Mornet E et al., 1989), codés par des gènes dupliqués sur le chromosome 8q21-22 (Wagner MJ et al., 1991). Leur expression est limitée au niveau du cortex surrénalien. Le cytochrome CYP11B1, le plus abondant, exprimé dans la zone fasciculée et réticulée (Erdmann et al., 1995), (Ogishima et al., 1992) a surtout une activité 11-β hydroxylase et un peu 18-hydroxylase. Il convertit le 11-désoxycortisol en cortisol et la 11-désoxycorticostérone en corticostérone, alors que le CYP11B2 exprimé dans la zone glomérulée a en plus une activité 18-oxydase ce qui lui permet de catalyser toutes les réactions nécessaires pour convertir la DOC en aldostérone (Curnow et al., 1991), (Kawamoto et al., 1992).

2.3. Voie de biosynthèse surrénalienne

Chez l'homme, la biosynthèse du cortisol, de l'aldostérone et des androgènes surrénaliens à partir du cholestérol fait intervenir six enzymes. Cinq enzymes appartiennent au groupe des cytochromes oxydases P450. Nous avons vu précédemment qu'un cytochrome est une hémoprotéine en position terminale d'une chaîne de transport d'électrons qui part du NADPH, passe par différentes protéines intermédiaires, pour aboutir à l'hydroxylation du stéroïde via le transfert des électrons et des ions H+ du cytochrome au stéroïde. Les cytochromes CYP17 et CYP21 sont cytosoliques et liés à la membrane du réticulum endoplasmique, les cytochromes CYP11A1, CYP11B1 et CYP11B2 sont situés dans la matrice de la mitochondrie, liés à la membrane interne. Cette disposition explique l'existence d'un va-et-vient des stéroïdes dans la cellule, comme le montre la première étape de la stéroïdogenèse : hydrolyse des esters du cholestérol, transport du cholestérol libre (C27) vers la membrane interne de la mitochondrie et

formation d'un stéroïde en C21, la prégnénolone. Ce stéroïde sort dans le cytosol pour être le substrat soit du cytochrome CYP17, soit de la HSD3B2.

Chaque enzyme de la stéroïdogenèse aurait une spécificité à un substrat donné expliquant les différentes réactions observées. Ainsi la 21-hydroxylase, de part sa structure et les acides aminés dont elle est constituée, a une affinité beaucoup plus grande pour la progestérone et la 17-OHProgestérone que pour les autres stéroïdes. La 11ß-hydroxylase a une grande affinité pour la désoxycorticostérone et la 11-désoxycortisol mais il peut directement hydroxylé la 17-OHP en 21-désoxycortisol quand ce substrat est en excès comme dans le déficit en 21-hydroxylase.

Pour les enzymes qui ont plus d'une activité, il existe des régulations différentielles des activités guidant la formation des produits. Ainsi différents facteurs favoriseraient l'activité 17,20-lyase de la CYP17 à partir de l'adrénarche : l'augmentation des partenaires d'oxydo-réduction, la NADPH –cytochrome P450 oxydoréductase et le cytochrome b5, et la phosphorylation du cytochrome P450. La présence de ces facteurs dans la réticulée favoriseraient la biosynthèse des androgènes et passeraient par la voie Δ5 jusqu'à la DHEA (Miller, 2005b).

3. Catabolisme des stéroïdes

Le catabolisme des stéroïdes a lieu dans le foie. La plupart vont subir des modifications de leur structure : addition de groupement hydroxyle, sulfate ou glucuronide, ce qui va les rendre plus soluble et plus facilement excrétables par les reins. Ce métabolisme par d'autres cytochromes hépatiques des stéroïdes actifs s'avère une nouvelle voie de recherche pour une certaine hétérogénéité tant sur le plan phénotypique que thérapeutique des sujets présentant le même génotype. Récemment les études de Gomes et al. le suggèrent ; des cytochromes hépatiques comme le CYP2C19 et CYP3A4 produisant de la DOC peuvent expliquer la survie des patients non traités ayant un génotype sévère (Gomes et al., 2009).

4. Mode d'action des hormones stéroïdes

L'hormone pénètre dans la cellule cible par diffusion passive ou facilitée ; elle se fixe à un récepteur spécifique intracellulaire, le récepteur des oestrogènes (ER), de la progestérone (PR), de l'aldostérone ou des minéralocorticoïdes (MR), des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR), exprimés dans certains types cellulaires. Dans leur forme inactive, les récepteurs stéroïdiens (SR) forment des complexes hétéro-oligomériques, où ils sont associés à des protéines chaperonnes, comme les protéines de choc thermique hsp90 et 70, à des

immunophillines, protéines capables de mimer des immunosuppresseurs comme la FKBP59 ou la cyclophilline CYP40. Ces protéines sont indispensables au bon fonctionnement de la signalisation hormonale, facilitant la capacité des SR à lier correctement l'hormone, intervenant dans leur compartimentation subcellulaire et modulant leur activité transcriptionnelle.

La localisation intracellulaire des récepteurs stéroïdiens dépend de leur type. Schématiquement, les ER et PR, sont même en l'absence d'hormone, localisés préférentiellement dans le compartiment nucléaire. A l'inverse, les GR, MR et AR sont en l'absence d'hormone, plutôt situés dans le compartiment cytoplasmique et transférés par un processus actif dans le noyau après liaison de l'hormone. Il a été proposé d'ailleurs que la Hsp90 pourrait intervenir dans le transfert nucléaire (DeFranco, 2002). Cette liaison d'hormone entraîne toute une série de modifications associant la libération des protéines associées, un changement de conformation, notamment la compaction et la transformation du domaine de liaison de l'hormone, et une modification de l'état de phosphorylation. Toutes ces modifications concourent à favoriser la dimérisation du récepteur et son interaction avec des séquences spécifiques de l'ADN, les éléments de réponse hormonale (HRE). Le SR est alors capable d'interagir avec des cofacteurs et des co-intégrateurs, qui recrutent à leur tour des histones acétyl transférases, ce qui modifie la transcription de gènes cibles en modulant positivement ou négativement la synthèse d'ARN messagers spécifiques codant les protéines responsables des effets physiologiques précis.

II. Structure 3D des cytochromes P450

1. Généralités

La structure 3D d'un cytochrome P450 a permis de mieux comprendre sa fonction. Les techniques expérimentales comme la diffractométrie aux rayons X, la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou microscopie électronique, sont les techniques de référence pour déterminer la structure 3D des protéines. Malheureusement la cristallographie est difficile lorsque les protéines ne sont pas assez solubles ou de taille trop importante pour être étudiées par RMN. Les premières structures cristallographiques ont pu être obtenues à partir des cytochromes procaryotes comme les cytochromes bactériens : CYP101, CYP102, CYP108 et CYP107A1 (connus comme P450cam, P450 BM3, P450-terp et P450eryf respectivement) (Boddupalli et al., 1992), (Cupp-Vickery and Poulos, 1995), (Hasemann et al., 1994), (Poulos et al., 1987); (Ravichandran et al., 1993). Les prédictions des relations structure-fonction ont été partiellement obtenues et plusieurs domaines fonctionnels ainsi proposés.

Pour les cytochromes impliqués dans la stéroïdogenèse, la prédiction structure-fonction a été extrapolée par alignement structural avec les cytochromes procaryotes. Cette méthode suppose que tous les cytochromes aient la même structure tertiaire surtout dans les domaines importants pour la fonction du cytochrome ce qui n'est pas toujours le cas ; le CYP102 n'a pas besoin par exemple de molécules pour avoir accès à ses partenaires d'oxydo-réduction (Peterson 1998). Une méthode alternative, la modélisation par homologie, est donc venue compléter l'alignement structural.

La construction d'un modèle à partir d'une autre structure 3D paraît possible si on considère que les protéines avec une séquence d'acides aminés similaires ont tendance à adopter la même structure 3D (Chothia et al., 1986). Jusqu'à récemment, les modèles structuraux des cytochromes humains ont été proposés en se basant sur des cytochromes bactériens, peu homologues (Mornet and Gibrat, 2000). Le cytochrome CYP102 a été utilisé comme le prototype le plus approprié pour les cytochromes microsomiaux, dont le CYP21 (Szklarz and Halpert, 1997), (Lewis and Lee-Robichaud, 1998), (Mornet and Gibrat, 2000)… mais aussi d'autres.

Depuis 2000, plusieurs cytochromes mammifères ont pu être cristallisés, permettant d'élucider plusieurs caractéristiques importantes pour la fonction de l'enzyme. Pour obtenir cette structure tridimensionnelle, la solubilité de l'enzyme a été obtenue par remplacement de la partie N-terminale ancrée à la membrane par une chaîne plus hydrophile. Cette solubilité est même augmentée si une queue C-terminale hydrophile est insérée. Actuellement, 7 cytochromes mammifères sont cristallisés (CYP2A6, CYP2B4, CYP2C5, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 et CYP3A4) et leur structure est déposée dans la « Protein data bank » ; CYP2C9, CYP2C8 et CYP3A4 étant des cytochromes P450 humains (Schoch et al., 2004), (Scott et al., 2003), (Williams et al., 2000a), (Williams et al., 2004), (Williams et al., 2003), (Yano et al., 2004), (Rowland et al., 2006). Le plus étudié étant le CYP2C5 (Cosme and Johnson, 2000), (Williams et al., 2000b), (Johnson et al., 2002), (Wester et al., 2003b), il est considéré comme une référence pour la modélisation par homologie (Kemp et al., 2005). L'étude des cytochromes mammifères nous a permis de conclure que la structure générale est conservée par rapport à celle des cytochromes procaryotes, la différence cruciale résidant dans la région de la liaison au substrat, bien spécifique à chaque protéine, ainsi que dans le site de reconnaissance au partenaire d'oxydo-réduction (l'enzyme NADPH cytochrome P450 oxydo-réductase, le cytochrome b5) et dans le domaine d'ancrage à la membrane du réticulum endoplasmique ou de la mitochondrie.

2. Structure générale et mécanisme d'action des cytochromes P450 microsomiaux

2.1. Structure générale

Les cytochromes P450 sont composés d'une partie protéique, l'apoprotéine et d'un groupement prosthétique ou **hème** constitué d'une protoporhyrine IX (figure 3) liée à un atome de fer par quatre liaisons covalentes. La cinquième liaison de coordination du fer est réalisée avec le groupement thiolate d'une cystéine conservée et positionnée dans le site catalytique. Enfin la sixième liaison permet la fixation de diverses molécules comme l'eau et l'oxygène moléculaire. Le fer est à l'état ferrique au repos et passe du bas au haut spin, après fixation du substrat dans le site hydrophobe.

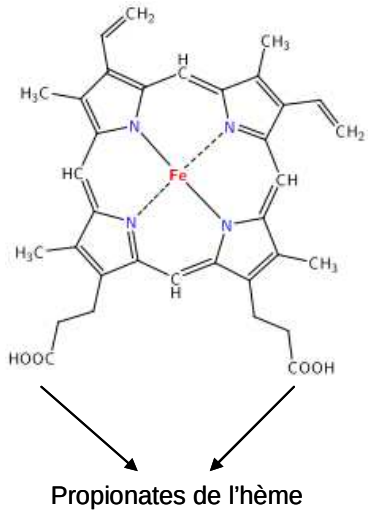


FIGURE 3 : Protoporhyrine IX lié à un atome de fer (Fe)

Historiquement, le premier cytochrome cristallisé et dont la structure a été résolue par le groupe de T.Poulos (Poulos et al., 1985) est le CYP101. Il a été isolé à partir de Pseudomonas putoda, ou camphre hydrolase. Sa structure ressemble à un prisme triangulaire composé de 12 hélices alpha, représentant 40% de la structure et 5 feuillets bêta représentant 10% de la structure (figure 4).

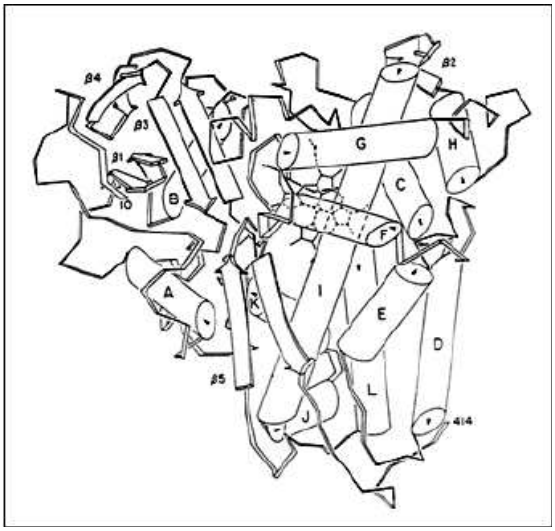


FIGURE 4 : Structure tridimensionnelle du CYP101 *(d'après Poulos et al.,1985)*

2.2. Mécanisme d'action

Les cytochromes P450 sont des enzymes à activité oxydo-réductase. Une fois le substrat pénétré dans le cytochrome, la réaction d'hydroxylation se déroule par insertion d'un atome d'oxygène. La séquence d'événements qui conduit à cette réaction est la suivante :

$RH + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow ROH + NADP^+ + H_2O$

Les événements peuvent être schématisés comme suit (figure 5):

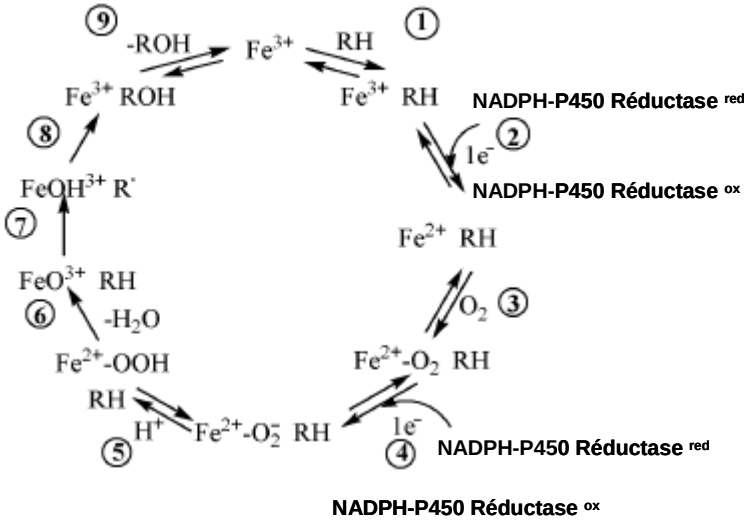


FIGURE 5 : Cycle catalytique général des cytochromes P450

1- Fixation du substrat sur le site actif de l'enzyme dont le fer hémique est sous la forme ferrique avec expulsion des molécules d'eau présentes dans le site actif et rupture de la liaison fer- H_2O.

2- Réduction du fer ferrique (3^+) en fer ferreux (2^+) par transfert d'un électron de la NADPH-P450 réductase qui devient oxydé.

3- Fixation de l'oxygène moléculaire sur la sixième liaison du fer hémique.

4- Incorporation d'un électron supplémentaire provenant soit du cytochrome b5 soit directement de la NADPH-P450 réductase, et réduction du dioxygène ferreux en complexe activé capable de réagir avec le substrat. A ce stade, on peut avoir production de peroxyde d'hydrogène suivant la réaction: $(Fe^{2+}\text{-}O^{2-})(RH) + 2H^{+} \rightarrow (Fe^{3+})(RH) + H_2O_2$. In vivo, la signification de cette étape non productive n'est pas claire.

5- Première protonation nécessaire à la libération d'H_2O de l'étape suivante.

6- Libération d'une molécule d'eau après une deuxième protonisation et clivage hétérolytique de la liaison dioxygène.

7- Transfert de proton du substrat vers l'oxygène et formation d'intermédiaires radicalaires OH° et R°.

8- Addition du radical hydroxyl (OH°) sur le radical R. A ce stade, il peut y avoir libération de radicaux libres dans la cellule, pouvant générer un stress oxydant.

9- Libération du produit

La présence du substrat dans le site de liaison à l'hème, situé au centre de la protéine, va intervenir dans le potentiel d'oxydo-réduction du fer. La présence du solvant dans la pochette de liaison va aider pour l'état d'oxydation, le potentiel et la liaison au substrat.

L'ensemble du processus catalytique se déroule selon une cascade d'événements conduisant simultanément à la libération du produit et à la régénération complète de l'enzyme.

Les P450s sont associés à des chaînes de transfert d'électrons distinctes suivant leurs localisations microsomales ou mitochondriales mais qui utilisent toutes les deux le NADPH comme source d'électrons (figure 6). Les CYPs du réticulum endoplasmique (type II) sont réduits par une protéine membranaire, la NADPH cytochrome P450 oxydo-réductase. Cette protéine comporte deux domaines contenant chacun une flavine. Deux électrons sont ainsi transmis du FAD au FMN puis à l'ion ferrique (Fe^{3+}) de l'hème du cytochrome. Pour les cytochromes mitochondriaux (type I), la chaîne de transfert des électrons comporte, outre une oxydo-réductase à flavine, une composante supplémentaire (protéine Fer-Soufre), la ferrédoxine (adrénodoxine dans les glandes surrénales) qui joue le rôle de donneur d'électrons.

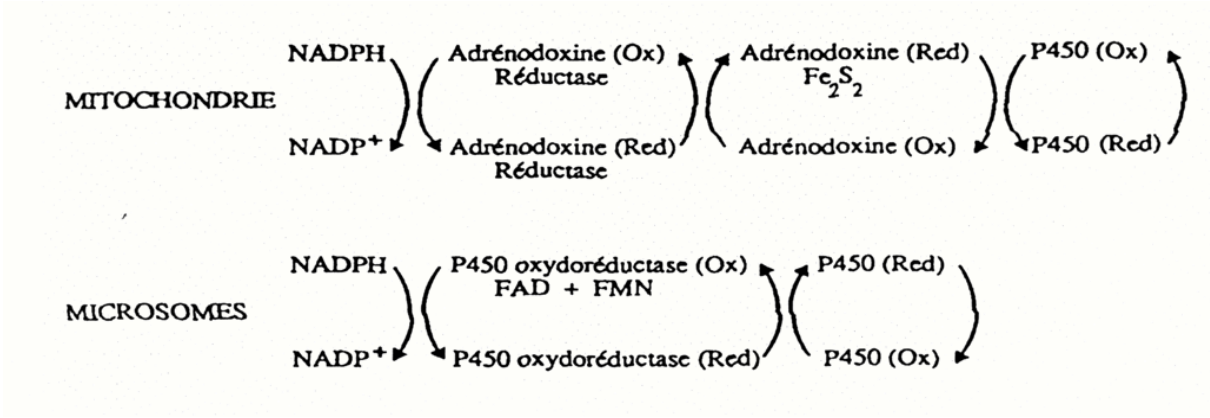


FIGURE 6 : Mécanisme d'action des cytochromes mitochondriaux et microsomiaux

❖ Le type I des CYPs inclut 7 CYPs sur 57 jouant un rôle clé dans la biosynthèse des stérols : CYP11A1, CYP11B1 et CYP11B2 et différentes enzymes de la voie de synthèse de la vitamine D (Domalik et al., 1991), (Mornet et al., 1989) .

❖ Les CYPs de type II sont à peu près une cinquantaine. Parmi ces 50, 20 participent à la biosynthèse des stéroïdes, stérols, acides gras, et eicosanoïdes ; 15 métabolisent principalement les agents xénobiotiques et les médicaments. Enfin les 15 derniers sont des enzymes orphelines dont les fonctions et les activités restent floues.

Les P450 de type II se retrouvent dans le réliculum endoplasmique, reçoivent leurs électrons du P450 oxydoréductase (POR) qui contient deux noyaux de flavines. Ce type II inclut le CYP17, CYP21 et CYP19.

Il faut distinguer aussi les cytochromes P450 de type III et ceux de type IV:

Le type III comporte la Thromboxane synthase (CYP5A) et allène oxyde synthase (CYP74). Ces CYPs n'utilisent pas de sources exogènes d'électrons puisqu'elles ont comme substrat des endopéroxydes et des hydropéroxydes respectivement (V . Ullrich, 1994), (Song et al., 1993).

Les cytochromes P450 de type IV, Oxyde nitrique réductase (CYP55A1), catalysent la réaction du radical NO en employant le NADH comme un donneur d'électrons direct sans l'intervention d'intermédiaires (Nakahara et al., 1993).

Nous détaillons ici seulement les cytochromes P450s de type I et II comportant les cytochromes de la stéroïdogenèse.

A/ Transfert d'électrons aux cytochromes P450 mitochondriaux (Type 1)

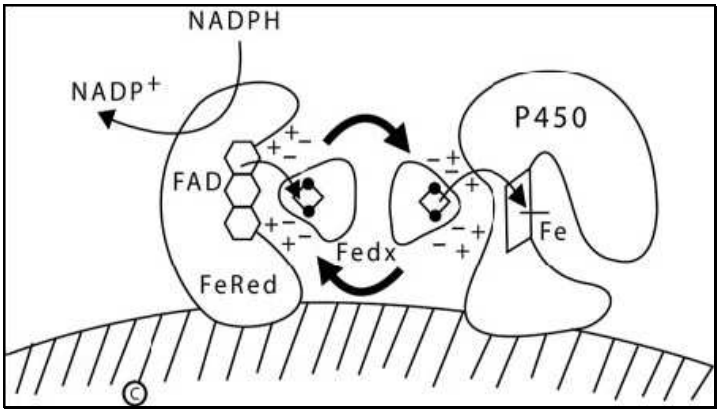


FIGURE 7 : Diagramme du transfert d'électrons aux P450 mitochondriaux (type I)

Le NADPH interagit avec la ferrodoxine réductase (FeRed), liée à la membrane mitochondriale interne et libère une paire d'électrons (figure 7). Le noyau isoalloxazine du FAD de la ferrodoxine réductase reçoit les électrons et les passe à son tour à la ferrodoxine (Fedx). Les résidus basiques positifs dans la ferrodoxine réductase et les résidus acides négatifs dans la ferrodoxine coordonnent l'interaction de la protéine, permettant aux électrons d'être reçus par le Fe_2S_2, représenté par un diagramme « ball-and-stick », au centre de la ferrodoxine.

La ferrodoxine se dissocie de la ferrodoxine réductase et diffuse à travers la matrice mitochondriale. La même surface de la ferrodoxine qui reçoit les électrons de la ferrodoxine réductase interagit avec le site de liaison au partenaire redox du P450 de type I avec des interactions électrostatiques coordonnant l'interaction protéine-protéine.

Les électrons du Fe_2S_2 au centre de la ferrodoxine traversent ensuite un conduit du P450 pour retrouver le noyau hème. Enfin la catalyse du substrat lié au cytochrome P450 est réalisée par l'intermédiaire du fer de l'hème.

B/ Transfert d'électrons aux cytochromes P450 microsomiaux (Type II)

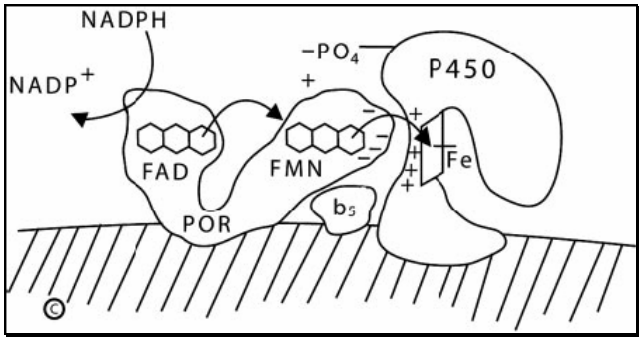


FIGURE 8 : Diagramme du transfert d'électrons aux enzymes P450 microsomales (type II)

Le NADPH réagit avec le cytochrome P450 oxydoréductase (POR) lié au réticulum endoplasmique et libère une paire d'électrons qui sont reçus par le noyau FAD (figure 8). Une fois arrivés dans ce dernier, un changement conformationnel surgit, permettant le passage d'électrons du FAD au FMN.

Dans un second temps, un changement conformationnel rend à la protéine son orientation originale, ceci va permettre au domaine FMN de POR de réagir avec le cytochrome P450. Les électrons du domaine FMN de POR atteignent l'hème pour achever la catalyse, comme c'est décrit pour les P450 de type I. L'interaction de POR avec P450 est coordonnée par des résidus acides négativement chargés sur la surface du domaine FMN de POR et des résidus basiques positivement chargés du site de liaison au partenaire d'oxydo-réduction du P450.

3. Architecture tridimensionnelle des cytochromes microsomiaux

L'architecture tridimensionnelle des cytochromes P450s est constituée de 12 hélices α (A jusqu'à L) et cinq ou six feuillets β (figure 9). En plus, plusieurs petites hélices sont présentes dans un certain nombre de cytochromes P450s (annotées B', F', G', J', K').

Le cœur de tous les cytochromes P450s est formé d'un faisceau de 4 hélices alpha (D, E, I et L) et des deux hélices alpha (J et K). Les caractéristiques structurales variables impliquées dans la liaison au substrat sont situées au niveau des hélices alpha A, B, B', F, G et leurs boucles adjacentes (Peterson and Graham, 1998), (Graham and Peterson, 1999) , (Gotoh, 1992) (figure 9).

Le segment F/G (hélice F, boucle F/G et hélice G) perpendiculaire à la structure conservée de l'hélice I (figure 10), étendue tout au long du CYP et ayant un segment très proche de l'hème constitue la structure typique des cytochromes. Les hélices F et G et les boucles F/G et B/C contrôlent l'accès au site actif du cytochrome.

Les structures hautement conservées du CYP sont les suivantes :

- L'ensemble riche en prolines à proximité de la partie N-terminale
- La boucle après l'hélice A
- Les hélices C et I
- La chaîne pour le transfert des protons située au centre de l'hélice I
- Une partie de l'hélice K
- La poche à cystéine (Lisitsa et al., 2003), (Mestres, 2005)

La différence entre la structure des CYPs bactériens et celles des mammifères réside surtout au niveau des sites de liaison au substrat, sites d'interaction avec les partenaires d'oxydo-réduction et l'ancrage à la membrane.

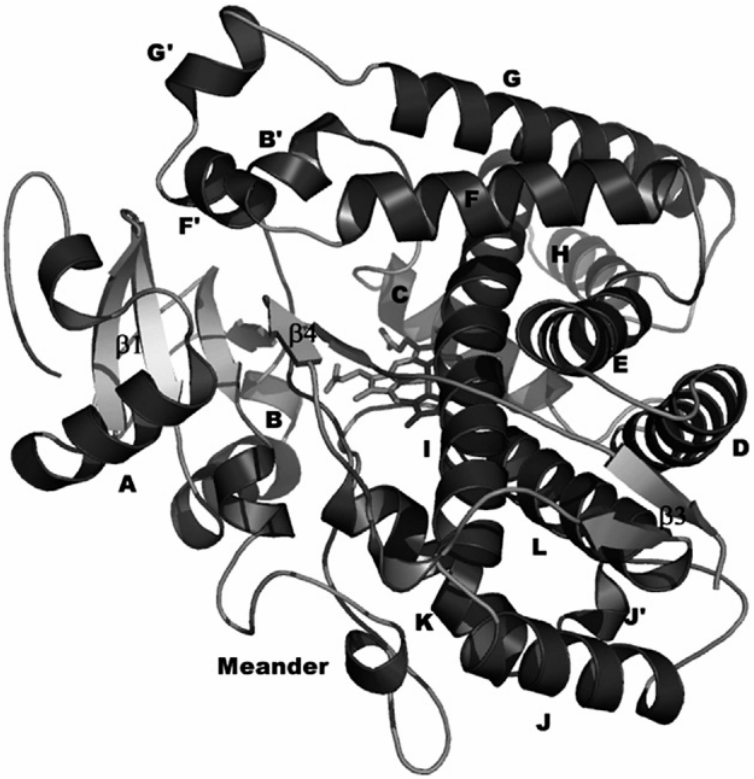


FIGURE 9 : Modèle 3D du cytochrome CYP2C9 déposé dans la base de données « protein data bank » sous le code «1OG2» *(d'après Otypeka, Biochimica et Biophysica acta 2007)*

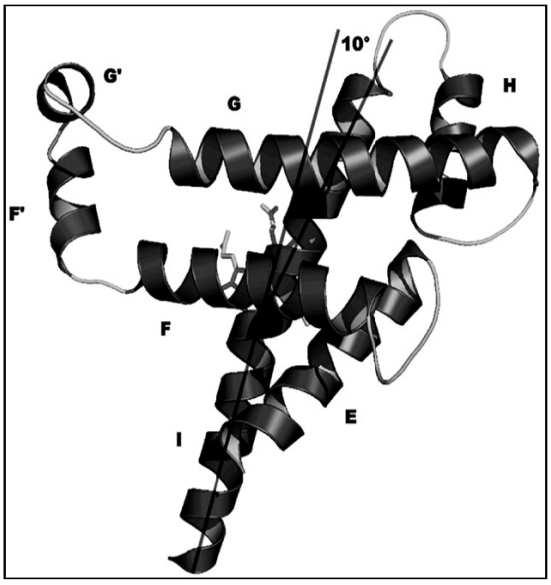


FIGURE 10 : Localisation du domaine F-G, inséré entre les hélices E et H, perpendiculaire à l'hélice I et formant un canal d'accès au site actif (*d'après Otyepka, Biochimica et Biophysica acta 2007*).

4. Différents domaines d'un cytochrome P450 microsomal

4.1. Domaine d'ancrage à la membrane

Les CYPs P450 sont des protéines liées à la membrane intégralement. Cette partie n'est pas étudiée car elle est remplacée par une partie plus courte et donc plus hydrophile pour rendre possible la cristallographie. Ainsi les interactions avec les membranes sont déduites d'expériences indirectes comme les études par mutagenèse dirigée puis transfection dans des cellules eucaryotes (Black et al., 1994), (De Lemos-Chiarandini et al., 1987), (Bridges et al., 1998) ou des modèles théoriques. Ces expériences montrent que la partie N-terminale est impliquée dans l'ancrage.

En effet l'enlèvement de la partie N-terminale du CYP2C5 produit une protéine qui continue à se lier à la membrane mais qui se dissocie dans un fort tampon de sel, suggérant une implication essentielle de la partie N-terminale.

Par ailleurs la surface hydrophobe dans le CYP2C5 est formée par trois séries de résidus :

- 30-45 avant l'hélice A (33-39 au niveau du CYP21)
- 60-69 après l'hélice A (54-63 au niveau du CYP21)
- 376-379 (376-379 au niveau du CYP21) qui correspond au feuillet β2-2 dans d'autres CYPs microbiaux.

De plus la partie C-terminale de la région entre les hélices F et G est formée d'un patch hydrophobe ; Le contact de la boucle F/G avec la membrane place un des canaux de passage du substrat (Canal 2 décrit ci-dessous) dans la membrane lipidique, ce qui peut être avantageux pour les substrats lipophiles. Il peut être spéculé que les substrats lipophiles entrent dans le cytochrome à partir d'un canal proche de la boucle F/G et les produits hydroxylés, quittent le site actif directement vers le cytoplasme à travers un autre canal.

Plusieurs résidus basiques situés au sein des patchs hydrophobes empêcheraient la translocation de toute la protéine dans la membrane du réticulum endoplasmique. (Sakaguchi et al., 1984), (Monier et al., 1988), (Szczesna-Skorupa et al., 1988).

4.2. Domaine de liaison à l'hème

L'hème est situé entre l'hélice L (se trouvant à la surface de la protéine) et l'hélice I à (située à l'intérieur de la protéine) (figure 11).

C'est une région très conservée au sein des cytochromes P450 (Hasemann et al., 1995).

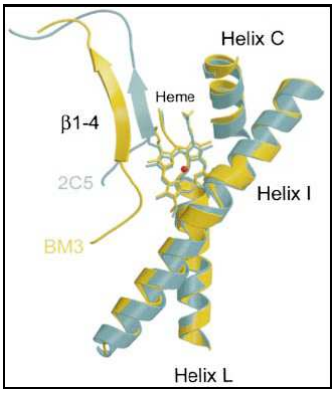


FIGURE 11 : Structure du site de liaison à l'hème *(d'après Williams, Mol Cell 2000)*

Les structures proches de l'hème incluent la boucle B'- C, l'hélice α I centrale, les feuillets β6-1/β1-4, la poche à cystéine et la partie N-terminale de l'hélice L. A noter la présence d'un environnement hydrophobe convenable pour l'hème.

Le ligand axial au cinquième site de coordination du fer de l'hème est fourni par le groupement sulfuré de la cystéine 428 du CYP21.

4.2.1. Poche à cystéine

L'hème est lié d'une façon covalente à une région protubérante « β-bulge » appelée **poche à cystéine** (Cystéine 428 dans le CYP21). Cette protubérance β sert à garder la cystéine dans un environnement hydrophobe. A part la cystéine il y a deux glycines strictement conservées et une phénylalanine.

- La première glycine 424 sert à la formation de l'épingle à cheveux
- La deuxième glycine 430 a deux rôles : permettre une meilleure pénétration dans l'hélice L et permettre à la poche à cystéine d'être proche de l'hème.
- Le troisième résidu très bien conservé est une phénylalanine, F 421, très proche de la liaison au fer sulfuré dans trois structures cristallisées: CYP101, CYP108 et CYP102. La mutation à ce niveau affecte l'efficacité du transfert d'électrons, mais cette phénylalanine ne joue pas de rôle critique à part garder un environnement hydrophobe pour l'hème.

Cette structure conservée FXXGX(HRK)XCXG sert ainsi comme signature des CYPs P450 (Otyepka et al., 2007).

L'environnement hydrophobe assuré par cette poche à cystéine est nécessaire pour établir un bon potentiel d'oxydo-réduction du fer de l'hème.

4.2.2. Coordination aux propionates de l'hème

Les chaînes latérales des groupements propionates de l'hème ont besoin de résidus chargés ou polaires pour accommoder leur polarité ou leur charge négative dans le milieu interne

hydrophobe de la molécule. Cette liaison des propionates à plusieurs acides aminés du CYP P450 a une influence sur le potentiel d'oxydo-réduction du fer de l'hème.

Les résidus impliqués sont strictement conservés au sein des cytochromes P450, au niveau du CYP21 on retrouve :

- Deux de ces résidus appartenant à la partie N-terminale de l'hélice C :

W116 et K120

- Un résidu au niveau du feuillet β1-4 : H 365
- Un résidu dans la poche à cystéine : R426

4.3. «Meander» et ERR triade

La région « meander » est une région en structure serpentée constituée d'une vingtaine d' acides aminés compris entre l'hélice K' et la poche à cystéine (R400 - L420 au niveau du CYP21).

Une triade Glu-Arg-Arg, E351/ R354/ R408 dans le CYP21, est associée avec la région du « meander » (figure 12). Les résidus E351 et R354 de l'hélice K sont invariables dans un grand alignement de cytochromes (voir figures 51-52-53 dans la partie résultats et discussion) alors que le résidu R408 dans le meander est remplacé suivant les différents cytochromes soit par une histidine soit par une asparagine.

La triade « ERR » formerait un motif dans le meander bloquant la poche à cystéine dans sa position ; ceci assurerait une association stable de l'hème avec la protéine. Ainsi la rupture de cette ERR triade pourrait entraîner la rupture de liaison à l'hème et donc l'arrêt de l'activité enzymatique.

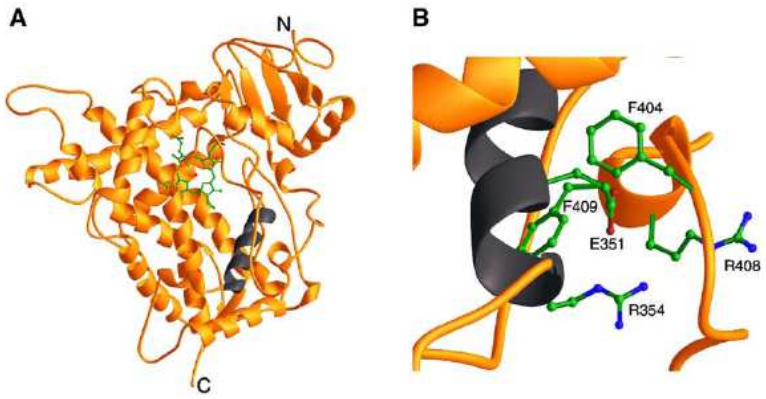


FIGURE 12 : Triade ERR (Glu 351, Arg 354 et Arg 408) motif stabilisant la structure 3D de la protéine emprisonnant la poche à cystéine de façon à assurer une liaison covalente avec l'hème (*d'après Krone, J mol med 2005b).*

4.4. Site actif : Liaison du substrat et catalyse

4.4.1. Volume du site

Le volume du site actif décrit dans la littérature varie d'une équipe à l'autre, ce qui est dû aux différences dans les algorithmes utilisés pour calculer ces volumes ; ainsi par exemple deux valeurs ont été obtenues pour le cytochrome CYP3A4: 1386 Å(48) et 520 Å. Néanmoins, les structures publiées jusqu'à présent peuvent être séparées en trois groupes suivant la taille de leurs sites actifs :

i) CYPs avec des sites actifs larges : CYP2C5, CYP2C8, CYP2C9 et CYP3A4

ii) CYPs avec des sites actifs de taille moyenne : CYP2B4 et CYP2D6

iii) CYPs avec des petits sites actifs : CYP2A6

4.4.2 Réseau de molécules d'eau

Les molécules d'eau formant un réseau au niveau du site actif ont pour rôle d'assurer les protons utilisés au cours de la réaction de catalyse. Ainsi, une molécule d'eau occupe la position axiale de l'atome de Fer. D'autres molécules d'eau peuvent résider au niveau de l'hélice I, ce qui est observé dans la structure du CYP2C9. La superposition de plusieurs structures identifie aussi cinq molécules d'eau entre l'hème, l'hélice K et la boucle qui la précède.

4.4.3. Canal du solvant

Le solvant se trouvant au niveau du cytosol assure les molécules d'eau nécessaires pour la réaction d'oxydo-réduction.

Le canal d'entrée du solvant dans le cytochrome est formé des hélices E, F et I et du feuillet β-5. La moitié des cytochromes P450s déjà cristallisés possède au moins un canal d'accès au solvant. Ce canal peut être aussi utilisé dans certains cas pour le passage du substrat, ce qui est suggéré par l'orientation de ce dernier vers ce canal dans la structure du CYP2C5 (Wester et al., 2003b), (Wester et al., 2003a).

4.4.4. Sites de liaison au substrat

A/ Canaux de passage des substrats et produits

Plusieurs canaux de passage sont présents dans la structure du cytochrome P450; ils permettent l'accès au site actif, enfoncé dans la protéine. Ces canaux ont pu être identifiés par Cojocaru et al.07 (Cojocaru et al., 2007) grâce au programme « CAVER ».

Canal 1: Passage entre les hélices C/C' et les hélices H ou L, et près de la boucle G-H et du feuillet β-2

Canal 2: Toutes les sous-classes du canal 2 à l'exception des canaux 2d et 2f, comportent les boucles B-C et l'hélice B'. Cette région paraît très importante pour la spécificité du substrat ce

qui la rend très variable au niveau séquence et structure. Elle est identifiée comme le premier site de reconnaissance du substrat (SRS-1) par Gotoh ,1992.
Canal 2a: Passage entre la boucle F-G, helices B'/boucle B-B'/boucle B-C et feuillet β1.
La partie C-terminale de l'hélice F forme le SRS-2 et la partie N-terminale de l'hélice G le SRS-3.
Canal 2b: Passage entre la boucle B-B' et les feuillets β1-β3 (SRS5 est au niveau du feuillet β-3).
Canal 2c : Passage entre les hélices G et I et les hélices B'/ boucle B-C. L'hélice I contient le SRS-4.
Canal 2ac: Passage entre le bout de la boucle B-C (ou hélice B') et l'hélice G, c.à.d. entre les canaux 2a et 2c.
Canal 2e: Passage à travers la boucle B-C.
Canaux 2d et 2f: Ils sont situés près du canal 2a d'où leurs noms en tant que sous-classes du canal 2 :
- 2d aurait un passage entre la partie N-terminale, les hélices a/A' et A.
- 2f aurait un passage entre les hélices F'/boucle F-G, et le feuillet β-5.
Canal 3 : Passage entre les hélices F et G ou au niveau de la boucle E-F.
Canal 4 : Passage à travers la boucle F-G.
Canal 5 : Passage entre les hélices K et K'.

B/ Mécanisme d'ouverture du canal et passage du ligand

Les canaux trouvés au sein du cytochrome P450 peuvent être classés en considérant le mécanisme d'ouverture.

Certains sous-groupes de canaux requièrent le mouvement des boucles B-C et F-G. D'autres requièrent juste un changement de conformation au niveau de certaines boucles.

La présence de deux motifs GXG au niveau des parties N et C –terminales de la boucle B-C augmentent la flexibilité de la boucle (Wester al.,2003) ; ces deux motifs permettent d'ouvrir facilement les canaux qui bordent cet élément structural. Ils existent dans la plupart des cytochromes P450s de type 2 sauf le 2W1, 2U1, 2J2, 2R1 et 2D6 qui ont à la place de ce motif GXG un autre motif DRP, au niveau de la partie N-terminale de la boucle B-C et un nombre variable de glycines à la partie C-terminale.Au niveau du CYP21 c'est les glycines 90 et 110 qui paraissent être impliqués dans l'entrée du substrat.

Vu que les cytochromes P450s sont liés à la membrane, on suppose que les substrats et produits emprunteraient des voies différentes. Ainsi la voie 2a est suggérée pour l'entrée du substrat et les voies 2c, 2e et les canaux d'accès du solvant pour la sortie du produit.

C/ Synchronisation de l'ouverture des différents canaux

Le canal 2a pourrait s'ouvrir grâce au mouvement de l'hélice F/boucle FG/hélice G et /ou l'hélice B'/boucle BC. Le mouvement de ces régions peut être accompagné du mouvement du

canal lui-même ou un mouvement global de la protéine influencé par la liaison du partenaire d'oxydo-réduction.

L'étude de la structure du CYP51, avec un canal 2a fermé et 2e ouvert a mené Podust et al. à proposer que le canal 2e doit être fermé pour que 2a s'ouvre. Ceci permettrait une synchronisation entre l'entrée du substrat et l'émersion du produit à travers des voies différentes. Cependant, en étudiant les structures CYP152A1, CYP2C5, CYP2B4 et P450epoK, les canaux 2a et 2e sont ouverts simultanément à la molécule d'eau marquée. Au niveau du CYP152A1, le canal 2a est occupé par une molécule de substrat pendant que le canal 2e contient une molécule d'eau entre le propionate de l'hème et la surface de la protéine. Le canal 2e permettrait à l'eau de s'échapper du site actif après sa génération dans une réaction de peroxygénation et permettrait l'accès au peroxyde d'hydrogène dans la molécule de cytochrome lié au substrat.

A noter que l'ouverture de ces différents canaux ne se fait pas de la même façon. Ainsi le canal 2c exige que la boucle BC soit poussée loin des hélices I et G. Le canal 2a nécessite la séparation des hélices F/G de la boucle BC. Le canal 2e, en revanche, exige que le ligand s'enfile à travers la boucle BC.

En conclusion, l'étude des structures cristallographiques suggère une seule entrée du substrat par le canal 2a impliquant la boucle F/G, l'hélice B'/boucle BC et le feuillet β1 alors que les études dynamiques montrent une spécificité des substrats entre les différents CYPs avec plusieurs canaux d'accès. L'eau, par exemple, emprunterait les canaux 1, 2c, 2e et le canal d'accès au solvant (en plus du canal 2a). Le canal 1 semblerait être une voie d'accès pour les molécules gazeuses au site actif. La question de savoir si le canal au solvant sert pour le passage des molécules d'eau ou s'il permet aussi le passage des larges ligands pour certains cytochromes comme le CYP2C9 ou CYP2D6 n'est pas encore résolue. Le canal 2e est aussi proposé comme une voie d'accès pour les molécules d'eau et les larges substrats et produits.

D/ Résidus impliqués dans la liaison au substrat

Le « footprinting » du substrat est basé sur la cristallographie des substrats liés à trois cytochromes CYP101, CYP102 et CYP108 (Hasemann et al., 1995). D'autres méthodes sont aussi utilisées comme la mutagenèse dirigée, la génie de protéines, l'alignement de séquences (Gotoh, 1992).

Ce « footprinting » était tout d'abord étudié par alignement structurale des protéines réalisé par Gotoh et al.,1992. Cet alignement a permis d'identifier 6 sites de reconnaissance du substrat, SRS-1 jusqu'à SRS -6, hypervariables au niveau des séquences (Gotoh, 1992) :

- SRS-1: Hélice B' et les régions flanquantes

- SRS-2: Région C-terminale de l'hélice F
- SRS-3: Région N-terminale de l'hélice G
- SRS-4: région centrale de l'hélice I
- SRS-5: L'aire β3
- SRS-6: la région centrale du feuillet β5

Ensuite l'étude structurale des trois cytochromes bactériens CYP101, CYP108 et CYP102 étudiés par Hasemann et al.,1995 validera les prédictions de Gotoh, 1992 sur ces différents SRSs :

❖ La plus grande concentration des résidus impliqués dans la liaison au substrat se situe dans la région β1-5 jusqu'à l'hélice B'et la boucle B'-C.

❖ SRS 2 et 3 sont formés par les faces inférieures des hélices F et G, respectivement, formant le « mouth of the active site channel ». Pour les enzymes avec une large région F-G (la plupart des cytochromes), l'inclusion de la boucle F-G et/ou la partie N-terminale de l'hélice G comme un SRS n'est peut être pas valide. Ainsi, seuls les P450s avec une région F-G courte (la plupart des enzymes bactériennes, comme le CYP101) ont la SRS-3.

❖ La SRS-4 formée de la partie I centrale jouerait un rôle dans la livraison des protons pour la catalyse. L'hélice I est aussi un membre de la bande de quatre hélices formant le cœur du cytochrome. Le rôle très important de cette partie de l'hélice I est montré par la très grande conservation de cette région sans jamais de délétion ni d'insertion. Quelques résidus peuvent être modifiées comme la paire aspartate/thréonine, dépendant de la spécificité du substrat ou des cinétiques des réactions.

❖ Dans la SRS-5, il existe quelques résidus impliqués dans la spécificité aux substrats, le reste est très conservé, ce qui peut être lié au rôle du SRS-5 dans la liaison à l'hème.

❖ SRS-6 est situé dans le tour du β-4 et inclut une partie de β 4-1, β 6-2 et β 4-2 avec des variations de séquences très modestes.

La variabilité de séquences entre les différents cytochromes P450s, liée à la spécificité du substrat, étant surtout prononcée dans l'hélice B' et la région F-G. Ces deux régions constituent la majeure partie du canal d'accès au substrat (Hasemann et al., 1995).

En 2006, l'équipe de Robins et al. (Robins et al.,2006) construisent un modèle 3D du CYP21 (code pdb : 2GEG) et identifient les résidus impliqués dans la liaison au substrat par homologie avec le CYP51 lié à l'estriol : Ces derniers concordent avec ceux de Gotoh et al.1992, avec un petit décalage des éléments de la structure secondaire des sites SRS1-3.

Au total 16 résidus ont été retrouvés dans une sphère de 5 Å autour du stéroïde

- Résidus 108 et 109 dans la boucle entre les hélices B'et C

- Résidus 203 - 207 dans la boucle connectant les hélices F et G',
- Résidus 287, 290-292 et 294-295 dans la partie centrale de l'hélice I
- Résidus 359, 363 et 364 dans la boucle entre l'hélice K et le feuillet β1-4.

Les résultats de « docking » ont montré que la progestérone pénètre dans ce site de liaison défini par modélisation par homologie.

La plupart de ces résidus sont hydrophobes, contribuant à l'interaction hydrophobe avec le substrat.

4.5. Liaison aux partenaires d'oxydo-réduction

4.5.1. Structure du cytochrome P450 oxydoréductase (POR)

Tous les cytochromes P450 type II reçoivent leurs électrons du NADPH par l'intermédiaire de POR.

La structure et la fonction de POR ont été bien détaillées par comparaison à la structure cristallisée du cytochrome P450 oxydoréductase du rat. La structure a été largement étudiée par plusieurs méthodes biophysiques, y compris la spectroscopie EPR, (Iyanagi and Mason, 1973), (Yasukochi et al., 1979), fluorescence temps-Résolu (Bastiaens et al., 1989), ^{31}P RMN (Bonants et al., 1990), (Narayanasami et al., 1992), et spectrométrie Raman (Sugiyama et al., 1985).

Le cytochrome P450 oxydoréductase est une protéine de 82-kDA, associée à la membrane. Elle a été isolée en 1969 (Lu et al., 1969), l'ADNc cloné en 1989 (Yamano et al., 1989). Le gène consiste en 16 exons occupant 32 kb sur le chromosome 7q11.2 (GenBank sequences GI: 4508114, GI:11181841, et GI: 24307876).

POR contient tout le système de transfert d'électrons, FMN et FAD, sans besoin d'une autre protéine comme la ferrodoxine, utilisée par les systèmes des CYPs P450 type I. Un accepteur d'électrons de POR physiologique peut être l'hème oxygénase microsomal (Hildebrandt and Estabrook, 1971) ou le cytochrome b5 (Chung et al., 1986a) et accepteur non physiologique le cytochrome c (Miller et al., 1988). Le premier électron délivré est toujours transféré plus rapidement que le deuxième (Oprian and Coon, 1982). Dans certains systèmes P450 type II, le cytochrome b5 peut substituer POR pour délivrer le deuxième électron, mais la présence de POR est obligatoire (Tamburini and Gibson, 1983), (Guengerich and Johnson, 1997).

POR est formé de quatre domaines structuraux (figure 13A et 13B); du N au C- terminal on retrouve :

1. Le domaine de liaison au FMN (représenté en bleu sur la figure 13 A)
2. Le domaine de connexion (rose)
3. Le domaine de liaison au FAD (turquoise)
4. Le domaine de liaison au NADP(H) (turquoise)

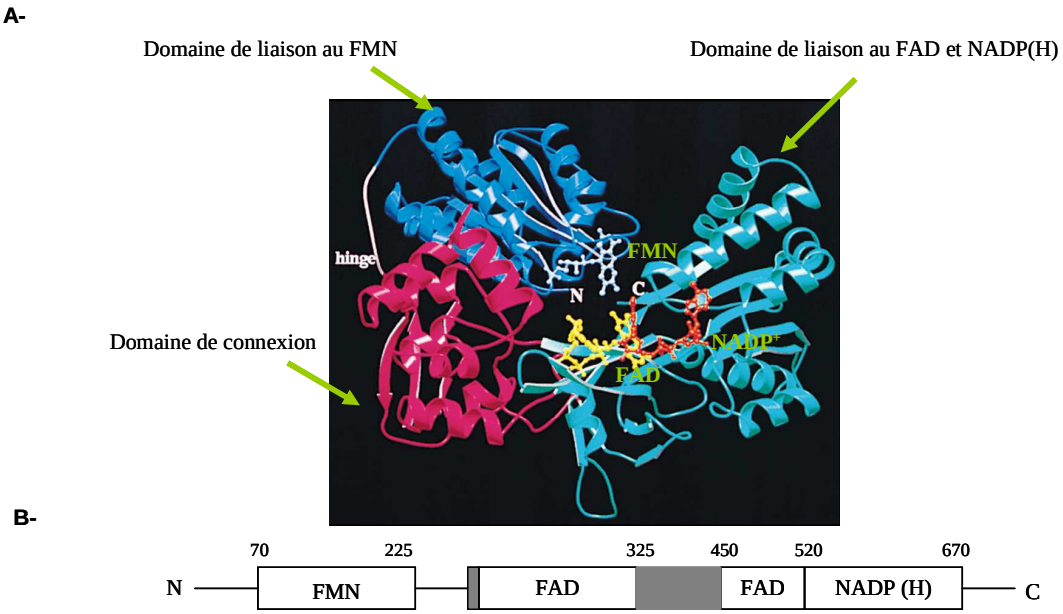


FIGURE 13 : Cristallisation de POR du rat, code PDB 1AMO
***A*-** Structure tridimensionnelle de la protéine POR. *Le domaine de liaison au FMN est présenté en bleu, le domaine de connexion en rose, et ceux du FAD et NADP(H) en turquoise. Les co-facteurs sont présentées en « bâton » avec le FMN 'bleu clair', FAD 'jaune', NADP$^+$ (orange). La région charnière (hinge) située entre le domaine de liaison au FMN et le domaine de connexion est marquée en blanc (d'après Wang, Biochemistry 1997)*
***B*-**Diagramme linéaire de la protéine POR indiquant les domaines de liaison aux cofacteurs. *Le domaine de connexion est représenté en gris. Les chiffres au-dessus de chaque rectangle correspondent aux positions relatives de chaque domaine. Les domaines de connexion et de liaison au FAD chevauchent dans le diagramme linéaire en dépit de leur structure distincte au niveau de la protéine.*

La structure des différents co-facteurs FMN, FAD et NADPH est représentée dans la figure 14.

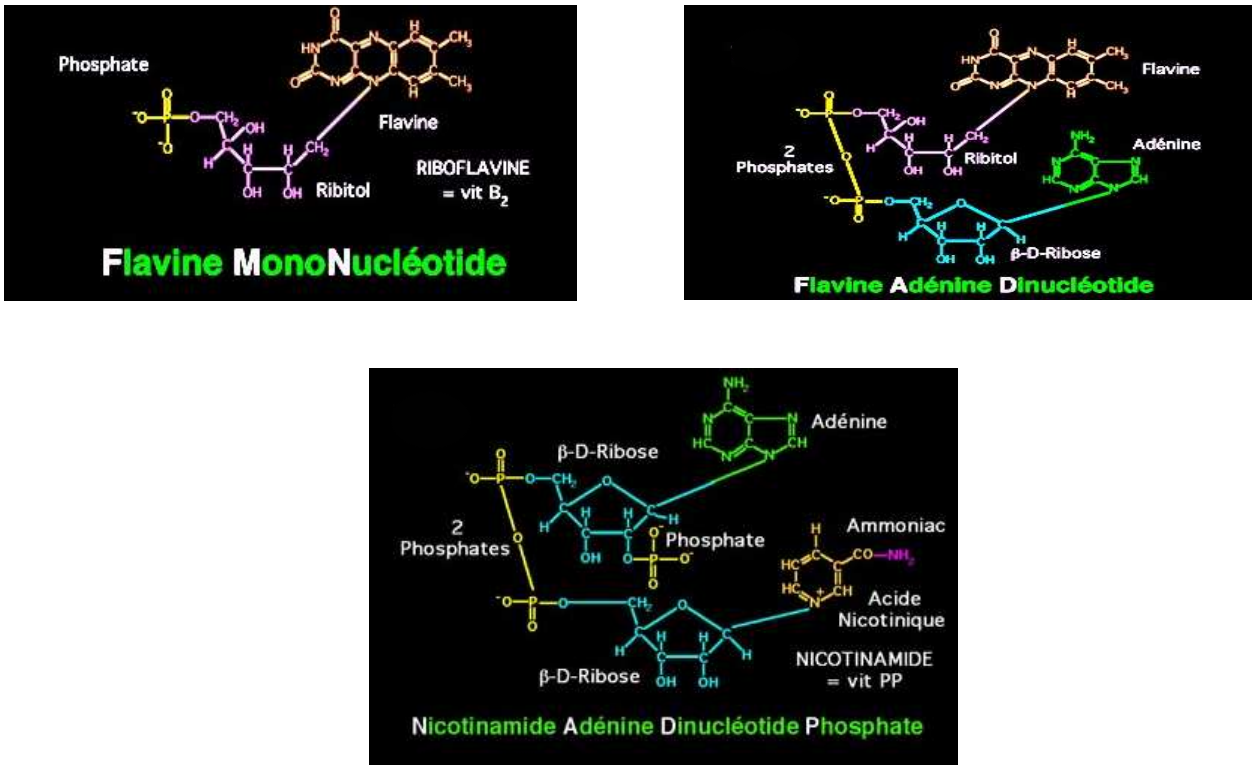


FIGURE 14 : Structures des cofacteurs FAD, FMN et NADP(H)

La flexibilité de POR a été étudiée récemment par l'équipe de hamdane et al. (Hamdane et al., 2009) afin de déterminer les modifications conformationelles nécessaires pour le passage des électrons du FAD au FMN. L'attention a été dirigée vers la région charnière entre FMN et le domaine de connexion très flexible.

La délétion de quatre acides aminés perturbe le transfert d'électrons du FAD au FMN, alors que le transfert du FMN au cytochrome P450 reste intact.

Le mouvement du domaine de liaison au FMN se fait par pivotement de la chaîne carbonée de l'arginine R243 au niveau de la partie C-terminale de la région charnière. Ce mouvement peut être visualisé sur le site suivant : http://www.molmovdb.org/cgibin/morph.cgi?ID=234385-8941

4.5.2 Domaine de liaison des cytochromes P450 type II au cytochrome P450 oxydoréductase

A/ Résidus au niveau de POR

La forme soluble de POR est capable de transférer les électrons du NADPH au cytochrome P450 et c'est la pyrimidine du cycle isoalloxazine du FMN qui va se mettre proche de la surface accessible au solvant de POR. Ainsi les électrons vont passer de ce côté du FMN pour traverser le domaine de liaison au FMN dans POR et arriver jusqu'à l'hème du cytochrome P450 type II.

Un mode de « docking » va permettre aux charges positives du cytochrome P450 de se lier à la surface de POR chargée négativement, cette surface est formée de la boucle entre le brin 4 et l'hélice E (residus 178 to 185) et la boucle entre le brin 5 et l'hélice F (résidus 210 – 214; résidus DDDGN). Cette dernière boucle contient les résidus acides impliqués dans le transfert d'électrons, démontré par des études chimiques de cross-link (Nisimoto, 1986) et des études de mutagenèse dirigée (Shen and Kasper, 1995).

En plus de ces interactions ioniques, des interactions hydrophobes à travers les membranes vont avoir lieu entre les domaines membranaires de POR et le cytochrome P450.

B/ Résidus au niveau du cytochrome P450

Une bonne partie des résidus impliqués dans l'oxydo-réduction réside dans le domaine de liaison à l'hème au cœur du cytochrome P450, formé d'un faisceau de 4 hélices D, E, I et L, les deux hélices J et K et la région « meander » (Hlavica et al., 2003).

En étudiant la structure du CYP2B4, 12 résidus chargés positivement ont été considérés importants pour la liaison avec le partenaire d'oxydo-réduction.

Parmi ces 12 résidus, 9 sont structuralement conservés avec la même charge dans la structure du CYP21. Six résidus sont très proches au niveau spatial: K117, R121 dans l'hélice C, R132 dans l'hélice D, R414 dans la boucle entre K'' et K''', R426 dans l'hélice K ''' et la R435 dans l'hélice L.

La modélisation par homologie du cytochrome CYP17 ainsi que des études expérimentales réalisées en mutant certains acides aminés du gène CYP17 ont montré l'implication dans l'oxydo-réduction du R347 et R358 résidant dans l'hélice J' et correspondant à R339 et A350 du cytochrome CYP21. R347, en particulier est un composé crucial pour cette interaction. La R358 du CYP17 ne correspond pas à une arginine dans le cytochrome CYP21, d'autres candidats seraient impliqués dans cette fonction. Tous les résidus arginine dans cette région (R339, R341, R354 et R356) sont impliqués dans des mutations provoquant un déficit en 21-hydroxylase, probablement par des perturbations électrostatiques (Robins et al., 2006).

Le résidu acide (acide glutamique) et la thréonine contigüs en positions 294-295 sont très conservés dans les différentes familles des cytochromes P450; il a été spéculé que la thréonine aide à la formation de la poche pour la liaison à l'oxygène. Dans les trois structures de Hasemann et al.,1995, il a été observé la formation d'une liaison hydrogène entre la thréonine et l'oxygène du carbonyle du quatrième acide aminé du côté N-terminal de la thréonine. Le groupement -OH de la thréonine va délivrer un proton à l'oxygène moléculaire lié au fer de l'hème. La chaîne

latérale de la thréonine est supposée adopter un nouvel angle de torsion pour laisser son groupement -OH interagir avec l'oxygène réduit.

La fonction de l'acide aminé acide (glutamate ou aspartate) adjacent à la thréonine reste peu claire. Il aurait un rôle structural *via* des interactions avec les acides aminés situé à ses environs ou bien un rôle dans les attractions électrostatiques de la molécule.

La chaîne latérale hydroxylée en position 294 (thréonine ou sérine) comme dans CYP3A1 ou CYP56 ou CYP17 est très importante même sans conservation de l'acide aminé lui-même. Cette chaîne latérale aurait un rôle dans la délivrance des protons.

III. Hyperplasie congénitale des surrénales

Nous abordons ici le déficit en 21-hydroxylase et un peu le déficit en 11ß-hydroxylase.

1. Le déficit en 21-hydroxylase

L'hyperplasie congénitale des surrénales par déficit en 21-hydroxylase (HCS), maladie génétique autosomique récessive, est le déficit de la stéroïdogenèse le plus fréquent puisqu'il représente plus de 95% de cas. Elle ne cesse d'être une maladie-phare au fil des progrès de la recherche: elle fut d'abord un modèle physiopathologique pour l'étude de la stéroïdogenèse ; dès 1974 la détermination de la 17OHP dans le liquide amniotique, puis la découverte d'une liaison génétique entre le système HLA et cette maladie ont permis le développement d'un diagnostic prénatal. Elle fut l'une des premières maladies à bénéficier d'un traitement prénatal. Ce traitement par la dexaméthasone permet de prévenir la virilisation *in utero* d'un fœtus féminin. Depuis la découverte du gène responsable en 1984, la complexité des anomalies géniques détectées permet d'aborder différemment la diversité phénotypique de cette maladie. Actuellement la pratique courante du génotypage des déficits en 21-hydroxylase, la possibilité de dépister les hétérozygotes dans la population générale et récemment de réaliser un diagnostic de sexe fœtal sur sang maternel dès 6.5 SA, ont modifié la démarche classique de ce diagnostic prénatal. Grâce à l'étroite collaboration entre la famille, les pédiatres et les endocrinologues adultes, les études à long terme de grandes cohortes sur le devenir tant somatique que psychologique va permettre d'évaluer nos pratiques médicales et chirurgicales dans un proche avenir. Récemment, des recommandations ont été écrites lors d'une conférence internationale de consensus organisée par les sociétés de Pédiatrie (2002)

1.1. Physiopathologie

Le déficit en 21-hydroxylase entraîne une diminution de la synthèse du cortisol et de l'aldostérone (figure 2). Par levée du rétrocontrôle négatif exercé par le cortisol, il en résulte une hypersécretion d'ACTH qui stimule l'activité et la synthèse des enzymes de la stéroidogenèse et contribue donc à l'accumulation de précurseurs en amont du bloc, la 17-hydroxyprogestérone (17-OHP) sur la voie des glucocorticoides et la progestérone sur la voie des minéralocorticoides. Ces précurseurs sont utilisés pour la synthèse d'androgènes surrénaliens et donc par conversion périphérique produisent une quantité excessive de testostérone, expliquant la virilisation d'un foetus féminin. De plus d'autres stéroides non 21-hydroxylés, en particulier le 21-désoxycortisol, normalement synthétisés en très faible quantité, sont très élevés et seront à la base de la détection des hétérozygotes (voir plus loin).

1.2. Epidémiologie

Le dépistage néo-natal a permis d'évaluer la fréquence moyenne de la forme classique dite "congénitale" à 1 cas sur 14000 naissances (soit 1/60 hétérozygotes) (Pang et al., 1988). Cependant cette évaluation élimine deux ethnies où la fréquence de cette maladie est beaucoup plus grande: de 1 sur 280 naissances chez les esquimaux Yupik de l'Alaska et de 1 sur 2000 dans l'île de la Réunion.

Pour l'équipe de New York, la forme non classique est la maladie génétique la plus fréquente: sa fréquence serait de 1/27 chez l'isolat des juifs Ashkenazi, 1/53 pour les espagnols, 1/63 pour les yougoslaves, 1/333 pour les Italiens et 1/1000 pour les autres caucasiens (Speiser et al., 1985). En fait lorsqu'on compare un groupe relativement bien défini comme les femmes présentant un hirsutisme, la fréquence de 14% de formes non classiques n'est pas retrouvée par les autres groupes; elle se situe entre 1.2% et 6% (Chetkowski et al., 1984), (Chrousos et al., 1982), (Kuttenn et al., 1985). Actuellement, on ne peut rien conclure des rares études récentes utilisant la confirmation diagnostique par le séquence du gène *CYP21A2* car il existe d'énormes biais de recrutement de leur population d'hirsutisme et de prémature pubarche. Des études prospectives sont nécessaires.

1.3. Les formes cliniques et leur diagnostic

1.3.1. Les formes classiques

Ces formes classiques dites congénitales sont appelées ainsi car le bloc enzymatique est suffisamment important pour entraîner une hyperproduction de testostérone qui durant la grossesse virilise le foetus féminin. Cette virilisation a été codifiée par Prader et est variable,

allant de la simple hypertrophie clitoridienne à un phénotype masculin avec cryptorchidie bilatérale (Stade V) (figure 15). Devant un nouveau-né avec des OGE ambigus, l'absence de gonades palpables doit évoquer un déficit en 21-hydroxylase et demander en urgence un dosage de 17-OHP.

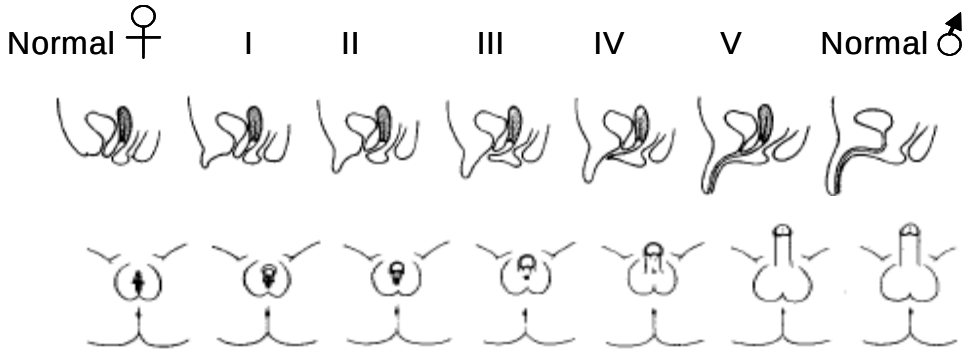


FIGURE 15 : Les différents degrés d'ambiguïté sexuelle selon la classification de Prader
Stade I : Hypertrophie clitoridienne isolée
Stade II : Hypertrophie clitoridienne+fusion postérieure des grandes lèvres
Stade III : Sinus uro-génital unique
Stade IV : Fusion complète des bourrelets génitaux; hypospade périnéal+sinus urogénital bas
Stade V : Phénotype masculin avec cryptorchidie bilatérale

A l'examen, certains évaluent le degré de virilisation par le rapport ano-génital : distance entre l'anus et la fourchette postérieure (fin antérieure de la fusion des grandes lèvres / distance anus-clitoris). Ces enfants ont bien des ovaires, un utérus et des trompes de Fallope.

Dans les deux sexes, le syndrome de perte de sel est du à un déficit en minéralocorticoïde majoré par l'effet anti-aldostérone de la 17-OHP qui est élevé. Cette perte de sel survient le plus souvent à partir de la 2ème semaine de vie. Le déficit en glucocorticoïdes affecte le métabolisme glucidique et aggrave le collapsus cardiovasculaire. L'hypoglycémie, survenant souvent lors de la première année de vie, reste une complication grave à cause des séquelles neurologiques.

Elle existe deux types de formes classiques : la forme avec perte de sel (salt wasting) et la forme virilisante pure (simple virilizing form). D'après l'article rapportant l'expérience mondiale du dépistage néonatal, 75% des formes congénitales s'accompagnent d'un syndrome de perte de sel (Pang et al., 1988). Avant le dépistage néonatal, il était assez facile de différencier ces deux formes cliniquement, actuellement la biologie moléculaire et l'évolution sous traitement sont les meilleurs critères de classement. En effet, il est très difficile cliniquement et biologiquement d'évaluer la perte de sel car tous ces nouveaux-nés dépistés sont le plus souvent traités avant l'apparition du syndrome clinique de perte de sel, ce qui est le but du dépistage néonatal.

La perte de sel dans la forme classique survient rapidement entre la 2ème et 3ème semaine de

vie et s'accompagne d'une rénine très élevée. L'instauration du dépistage néonatal avait été faite pour éviter le décès des nouveaux-nés males, mais des études rétrospectives montrent que même chez des filles présentant une virilisation à la naissance le diagnostic pouvait être fait seulement après cette perte de sel.

Dans les formes sans perte « dite virilisante », la perte de sel peut survenir à tout moment dans une situation de stress. Ces formes présentent le plus souvent une perte de sel biologique comme le témoigne l'augmentation de la rénine dans les premiers mois de vie. Le diagnostic est facile chez la fille à cause de la virilisation des OGE, parfois devant une prématurе pubarche survenant avant 5 ans. Chez le garçon le diagnostic est beaucoup plus difficile et se faisait avant le dépistage néonatal devant une pseudo-puberté précoce ayant débuté avant 4 ans.

Le diagnostic biologique ne pose aucun problème. Le plus souvent le taux plasmatique de base de la 17-OHP est suffisant (>200 nmol/L, soit 60 ng/ml). La rénine est toujours élevée après une semaine de vie. Le dépistage néonatal est très efficace car toutes les formes classiques sont dépistées. En revanche, il existe de très nombreux faux-positifs chez le prématuré. Un taux qui reste normal ou baisse permet d'éliminer ce diagnostic. Dans les cas difficiles, la recherche des mutations du gène *CYP21A2* est la meilleure solution.

1.3.2. Les formes non classiques

Les formes tardives (FT) se manifestent au cours de la puberté ou le plus souvent après par des signes d'hyperandrogénies très variables et peu spécifiques (hirsutisme, irrégularités menstruelles, stérilité), mais elles peuvent rester totalement asymptomatiques. Le dosage beaucoup plus fréquent de la 17-OH progestérone devant une avance staturale ou l'apparition d'une pilosité chez l'enfant prépubère permet de diagnostiquer plus précocement ces formes tardives. Elle se différencie de la forme classique par une absence d'ambiguïté sexuelle, seule est parfois notée une hypertrophie clitoridienne qui est alors isolée. Par ailleurs, les formes asymptomatiques ne sont pas rares, notamment chez les patients de sexe masculin qui sont concernés pour la moitié d'entre eux.

L'élément biologique qui permet de poser avec certitude le diagnostic de forme non classique est le pic de 17-OHP plasmatique lors du test ACTH. Dans certains cas, un taux de 17-OHP de base peut suffire, à condition qu'il soit réalisé le matin et en phase folliculaire précoce. Le problème posé est le seuil à retenir : la valeur de 9 nmol/ l (3 ng/ml) avait été proposée mais il s'est avéré que des patients atteints de forme non classique peuvent avoir un taux inférieur et à l'inverse qu'un simple stress peut majorer un taux de 17-OHP de base chez des sujets indemnes de tout déficit en 21-hydroxylase. En fait, il semblerait que toute femme qui présente un

hirsutisme associé ou non à une dysménorrhée et une stérilité, bénéficie au cours de son existence d'un test à l'ACTH. Nous proposons donc de réaliser d'emblée ce test à l'ACTH pour dosage de la 17-OHP (aux temps 0, 60' et 90' après l'injection). Il peut être intéressant de conserver du plasma pour doser dans un second temps le 21-désoxycortisol dans les cas où le pic de 17-OHP est insuffisant pour poser un diagnostic.

D'après les études moléculaires réalisées dans notre laboratoire, la valeur seuil de 17-OHP sous ACTH au-dessus de laquelle il faut retenir le diagnostic de forme non classique est de 60 nmol/l (20 ng/ml) ; pour les valeurs de 17-OHP entre 36 nmol/l (12 ng/ml) et 60 nmol/l (20 ng/ml), c'est la biologie moléculaire qui permet de distinguer les simples hétérozygotes des formes non classiques. Enfin, si le pic de 17-OHP sous ACTH est inférieur à 36 nmol/l (12 ng/ml), les sujets ne sont pas porteurs d'une forme non classique : il est alors difficile de trancher entre hétérozygotes pour le trait 21-hydroxylase et homozygote sain et c'est dans ces cas que le dosage de 21-désoxycortisol sous ACTH est intéressant.

2. Le déficit en 11β-hydroxylase

C'est l'hyperplasie congénitale des surrénales la plus fréquente après le déficit en 21-hydroxylase. Elle représente moins de 5% des HCS.

2.1. Physiopathologie

Les dernières étapes de la biosynthèse du cortisol et de l'aldostérone sont mitochondriales. Seule la première étape 11β-hydroxylation est commune. Deux étapes supplémentaires, la 18-hydroxylation et la 18-oxydation, sont nécessaires pour la synthèse de l'aldostérone par la zone glomérulée de la corticosurrénale. Pendant longtemps, on pensait qu'une seule enzyme catalysait la 11β-hydroxylation et les dernières étapes de la biosynthèse de l'aldostérone.

La découverte des deux gènes en tandem, CYP11B1 et CYP11B2, a permis de bien comprendre la physiopathologie du déficit en 11β-hydroxylase et des anomalies de la biosynthèse isolé de l'aldostérone. Ils sont localisés sur le chromosome 8 dans la région q21-22 (Mornet et al., 1989) et séparés par environ 40 kpb. Bien que leurs parties codantes (9 exons) présentent une identité de 95%, la taille de l'intron 5 qui est plus grand de 440 pb dans le gène CYP11B2 est très utile pour le choix des amorces lors des études moléculaires. Les enzymes CYP11B1 et CYP11B2 sont constitués de 479 acides aminés après coupure des 24 AA de peptide signal. Bien qu'ils ne différent que de 32 AA (incluant les AA polymorphiques), seulement deux acides aminés sont spécifiques de l'activité aldosynthase, la glycine en 288 (exon 5) et l'alanine en 320 (exon 6), remplaçant respectivement la sérine et la valine de

CYP11B1 (Curnow et al., 1997). Ceci a été confirmé par deux situations pathologiques dues à l'existence de « crossing-over » inégaux. Tous les patients avec un hyperaldostéronisme sensible aux glucorticoïdes (GSH) ont un gène hybride *CYP11B1/B2* avec la jonction B2 et B1 située entre l'intron 2 et l'intron 4 (Lifton et al., 1992). En revanche, les déficits en 11β-hydroxylase ont un gène hybride CYP11B2/B1 avec un jonction B1-B2 situé au-delà de l'exon 6 (Portrat et al., 2001). De même ces résultats confirment l'expression spécifique de CYP11B1 dans la zone fasciculée (75% de la cortico-surrénale) et CYP11B2 dans la zone glomérulée (10% de la cortico-surrénale). Dans les conditions physiologiques, l'expression du CYP11B2 est très faible par rapport à celle du CYP11B1. Ceci explique que la concentration sérique de l'aldostérone (de l'ordre de 50 pmol/L) est 10000 fois plus faible que celle du cortisol (de l'ordre de 500 nmol/L).

Toutes ces données ont permis une meilleure compréhension de la physiopathologie du déficit en 11β-hydroxylase. Le blocage de l'activité 11β-hydroxylase du à des mutations du gène *CYP11B1* explique l'accumulation des deux précurseurs, le 11-désoxycortisol (composé S) et de la désoxycorticostérone (DOC), produits essentiellement par la zone fasculée-réticulée, due à une hypersécrétion d'ACTH secondaire à la diminution de la synthèse de cortisol. Bien que la DOC soit moins puissante que l'aldostérone, sa sécrétion élevée inhibe le système rénine-angiotensine et donc la synthèse d'aldostérone, qui n'est pas directement affectée car le CYP11B2 reste fonctionnel. La conséquence est l'absence de perte de sel et le risque de développement d'hypertension en cas d'absence de diagnostic ou de mauvaise compliance du traitement.

2.2. Clinique

La clinique du déficit en 11β-hydroxylase diffère de celle du déficit en 21-hydroxylase par le fait de l'hypersécrétion de DOC et de ses métabolites qui ont un effet minéralocorticoïde.

Chez la fille, le diagnostic se fait à la naissance devant une virilisation des OGE sans perte de sel. Cette forme ressemble à la forme virilisante pure du déficit en 21-hydroxylase, mais elle n'est pas dépistée lors du dépistage néonatal (expérience personnelle sur plus de 20 ans). Chez le garçon, le diagnostic est tardif et se fait devant un tableau de pseudo-puberté précoce survenant le plus souvent avant l'âge de 3 ans : pilosité pubienne avec augmentation de la verge contrastant avec des testicules de petit volume, avance des âges statural et osseux. Dans les deux sexes, la perte de sel est absente et doit remettre en cause le diagnostic au profit d'un déficit en 21-hydroxylase ou d'une autre cause, notamment rénale. Bien qu'elle soit citée dans les « textbooks » et la littérature, la perte de sel est très rare et survient après la mise en route du traitement par les glucorticoïdes. En revanche, l'hypertension artérielle est un signe majeur mais elle apparaît le plus souvent lorsque le diagnostic est tardif après l'âge de 4 ans ou lorsque le

traitement est mal suivi (Chabre et al., 2000). Elle est la cause des complications graves comme l'apparition d'une rétinite ou néphropathie hypertensive.

Classiquement, la forme non classique (tableau identique à la 21-hydroxylase) est largement décrite, mais un seul cas a été confirmé par la biologie moléculaire. Le plus souvent, il s'agit de formes classiques non diagnostiqués dans l'enfance se révélant à l'âge adulte par une hypertension avec rénine basse associée ou non à un incidentalome.

2.3. Biologie

Le diagnostic est évoqué par l'augmentation des taux sériques de 11-désoxycortisol associé avec un taux de rénine plasmatique bas. Il est nécessaire de confirmer le diagnostic par un test à l'ACTH. Un taux supérieur à 60 nmol/L (environ 20 ng/ml) est pathognomonique. En effet, chez le prématuré ou dans les deux premiers mois de la vie, le pédiatre devant une légère élevation de la 17-OHP demande un dosage de 11-désoxycortisol qui revient très élevé. Il s'agit en fait de fausses élévations dues à des croisements avec des stéroïdes sécrétés par la zone fœtale lorsque des trousses commerciales sont utilisées. Dans ces cas, le test à l'ACTH pratiqué deux mois plus tard revient normal. Devant des taux un peu élevés de 17-OHP, le rapport Δ4/17-OHP est très utile. En effet ce rapport est toujours supérieur à 1 dans les déficits en 11β-hydroxylase alors qu'il est effondré dans les déficits en 21-hydroxylase (<0,5) (Forest, 1985). Cette augmentation préférentielle de la Δ4 s'explique par le fait que la 11β-hydroxylase inactive la Δ4 en 11β-androsténedione.

2.4. Etude moléculaire

Toutes les études publiées sur l'étude moléculaire de ce déficit rapportent une bonne corrélation entre le génotype et le phénotype. A ce jour, environ 40 mutations différentes ont été décrites. La mutation R448H est la plus fréquente, notamment chez les immigrants juifs d'origine marocaine (White et al., 1991). Néanmoins, une étude récente chez 236 juifs d'origine marocaine pour vérifier la fréquence évaluée à 1/40 de la mutation R448H ne retrouve que 2 hétérozygotes (Paperna et al., 2005). Ceci démontre bien les biais d'évaluation des fréquences de ces maladies rares. De même le séquencage du gène CYP11B1 est moins performant dans le déficit en 11β-hydroxylase que celle de *CYP21A2* dans le déficit en 21-hydroxylase. Dans notre de plus de 100 familles, seulement 75% des patients sont homozygote ou hétérozygote composite pour des mutations du gène CYP11B1. Bien que le tableau clinico-biologique soit typique, une seule ou même aucune mutation est retrouvée dans les 25% de cas. Dans certains cas, des réarrangements particuliers permettent d'élucider ce dilemme (Portrat et al., 2001) mais cette

impossibilité de trouver les mutations de CYP11B1 reste à élucider. En revanche, le génotype a été élucidé dans toutes les familles d'origine tunisienne (16 familles) où seulement deux mutations G379V et R356X, ont été identifiées (Chaabouni et al., 2005).

IV. Gènes associés au déficit en 21-hydroxylase

1. Caractéristiques des gènes de la 21-hydroxylase

Le gène codant pour le cytochrome CYP21 fut découvert en 1984 (White and Speiser, 2000) et localisé comme prévu sur le bras court du chromosome 6 à 600 kb du locus HLA-B et à 400 Kb du locus HLA-DR. En fait il existe 2 gènes homologues, *CYP21A2* et *CYP21A1P*, longs de 3.4 kb, dont les séquences nucléotidiques ont une différence de seulement 87 à 88 paires de bases (pb) (figure 16). Les deux gènes sont constitués chacun de 10 exons et 9 introns, se distinguant donc de ceux codant pour les autres cytochromes P450 qui contiennent 7 à 9 exons (Chung et al., 1986a). Ils sont situés en tandem en aval de la portion 3' terminale des 2 gènes codant pour le quatrième composant du complément, C4A et C4B (figure 16). Le gène C4B existe sous 2 formes, longue et courte du fait de la présence ou non d'un intron de 6.8 kb à l'extrémité 5' du gène. Ce polymorphisme peut être utilisé dans l'identification des haplotypes parentaux d'enfants atteints.

2. Organisation du locus de la 21-hydroxylase

La grande homologie entre les fragments dupliqués C4A-*CYP21A1P*-XA et C4B-*CYP21A2*-XB, longs de 35 kb, explique la fréquence des réarrangements importants (duplication, délétion, conversion génique) ou d'échanges constants entre les gènes *CYP21A2* et *CYP21A1P* rendant non fonctionnel ce dernier. Toutes les formes cliniques sont associées à une anomalie génétique.

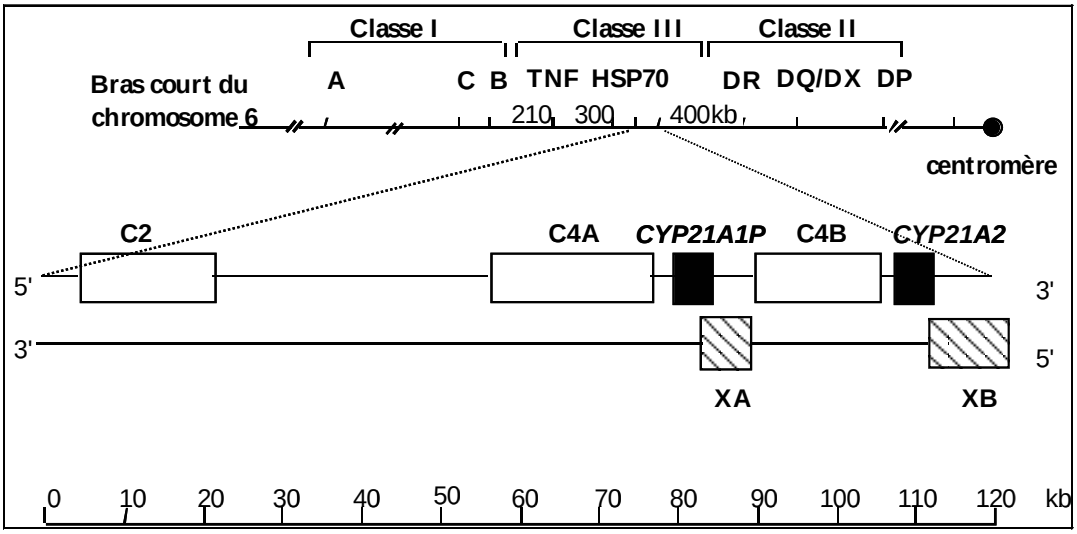


FIGURE 16 : Carte génique du bras court du chromosome 6

V. Lésions des gènes CYP21 décrites dans la littérature

1. Larges lésions

La région 6p21.3 renfermant le gène *CYP21A2* est le siège de recombinaisons par crossing-over du fait de la grande homologie de séquence de ce tandem dupliqué C4-*CYP21A2* : ces réarrangements sont des délétions du gène, des conversions géniques du gène en le pseudogène, des duplications. D'après les études par Southern blot, des larges lésions du gène *CYP21A2* sont identifiées sur environ 20 à 25 % des allèles : le plus souvent, il s'agit d'une délétion de 30 kb (11.4%), plus rarement d'une conversion génique de *CYP21A2* en *CYP21A1P* (8.9%) ou d'une délétion rare (1.8%) (Morel and Miller, 1991).

1.1. Délétions et larges conversions géniques

La méthode de Southern, d'abord utilisée, a mis en évidence une large délétion de 30kb (qui englobe l'extrémité 3' de *CYP21A1P*, les gènes XA et C4B et l'extrémité 5' de CYP 21), puis des conversions géniques de l'extrémité 5' de *CYP21A2* en *CYP21A1P*. Sujet de nombreuses controverses au début, la conversion génique découverte par Donohoue et al. (Donohoue et al., 1986) ne s'accompagne pas de perte de matériel génétique. Dans les deux situations, le gène qui en résulte est un hybride *CYP21A1P/CYP21A2* dont l'extrémité 5' correspond à *CYP21A1P* et l'extrémité 3' à *CYP21A2*. Une autre délétion beaucoup plus rare, identique à celle observée avec *CYP21A1P*, fait disparaître complètement l'unité C4B-*CYP21A2*. La fréquence de ces réarrangements géniques varie selon les auteurs et la forme clinique de la

maladie (Collier et al., 1989), (Higashi and Fujii-Kuriyama, 1991), (Mornet et al., 1991), (Speiser et al., 1992), (Morel et al., 1992). Cette fréquence est de 22% toutes formes cliniques confondues ; 13% de larges délétions et 9% conversions géniques.

1.2. Duplications

Les duplications des gènes *CYP21A2* et C4B ont été identifiées au départ par Southern et associées à l'haplotype HLA-B14, DR1 chez certains patients atteints de forme non classique (Pollack et al., 1981), (Garlepp et al., 1986), (Mornet et al., 1986), (Werkmeister et al., 1986), (Speiser et al., 1988), (Morel et al., 1989). Ensuite un déséquilibre de liaison a été décrit entre ces haplotypes et la mutation p.V281L. A noter que les duplications des gènes *CYP21A2* et C4B et le type HLA-B14 ont également été identifiés sur les chromosomes de patients atteints de forme virilisante pure et sur des chromosomes non mutés.

2. Mutations ponctuelles

Environ 75% des chromosomes étudiés ne présentent pas d'anomalie du gène *CYP21A2* détectable par la méthode de Southern. Les techniques d'amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction), puis de nos jours le séquençage du gène entier, ont montré que la majorité des lésions responsables de 21OHD sont des mutations ponctuelles.

Une centaine de mutations ponctuelles rarissimes, voir individuelles, ont été décrites (White and Speiser, 2000), (Robins et al., 2006). Les douze mutations les plus fréquentes sont retrouvées dans le pseudogène *CYP21A1P*, d'où la déduction d'un mécanisme de microconversion génique impliquée dans la majorité des cas (Morel et al., 1991).Il est possible d'avoir accès à toutes les mutations du gène *CYP21A2* découvertes jusqu'à ce jour car elles sont déposés sur deux sites : http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php ou http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm .

2.1. Mutations situées dans les parties codantes du gène

2.1.1 Mutations non-sens

Elles résultent de la substitution d'une base aboutissant à la formation d'un codon stop TAA, TAG ou TGA ; il y aura donc également arrêt prématuré de la traduction et absence d'activité enzymatique.

La mutation non-sens la plus fréquente est la mutation p.Q318X qu'il faut distinguer d'un haplotype ponctuel associant une duplication C4A-*CYP21A1P*-C4B-*CYP21A2*-C4B-*CYP21A2* ; comme un des gènes *CYP21A2* portait la mutation p.Q318X, certains auteurs croyaient que le patient porteur de cet haplotype était hétérozygote pout la p.Q318X (Baumgartner-Parzer et al., 2003).

2.1.2 Mutations responsables d'un décalage du cadre de lecture

Elles décalent le cadre de lecture par délétion ou insertion d'une, de deux ou d'un non multiple de trois bases ; étant en général responsables d'un arrêt prématuré de la traduction, elles donnent des protéines tronquées donc non fonctionnelles. Elles sont de ce fait responsables d'une absence d'activité enzymatique.

Les trois mutations les plus fréquemment décrites sont la délétion de 8 pb dans l'exon 3 (c.329_338del8), l'insertion d'un T dans l'exon 7 (c.920dupT) et la délétion de 2 G avec insertion d'un C dans l'exon 10 (c.1447_1448delGGinsC) :

- La délétion de 8 pb dans l'exon 3 est responsable de l'apparition d'un codon stop prématuré à la place de l'Arginine 132.

- La mutation c.920dupT (p.L307fs) entraîne un codon stop prématuré en position 312, donc avant les exons 8 et 10 indispensables à la fonction enzymatique.

- Dans le cas de la mutation 1447_1448delGGinsC, le codon stop naturel disparaît et un nouveau apparaît dans la partie non codante (p.R483fs).Il en résulte une protéine plus longue. Comme cette mutation est associée à une forme grave il doit exister un changement de conformation de la protéine à l'origine de la baisse d'activité 21-hydroxylase.

2.1.3 Mutations faux sens

Elles représentent la plupart des mutations ponctuelles retrouvées dans le déficit en 21-hydroxylase. Lorsqu'elles sont délétères, le changement par substitution d'une base entraîne un changement d'acide aminé.

A/ Activité nulle

a) Triple mutation p.I236N, p. V237E, p. M239K dans l'exon 6

De mécanisme physiopathologique encore inconnu, elle associe de façon constante les 3 substitutions p.I236N, p.V237E et p.M239K. Chacune de ces trois mutations a été testée *in vitro* séparément en plus des trois mutations associées (Robins et al., 2005). Les enzymes avec la triple mutation ainsi que le mutant p.V237E sont sans activité détectable. Le mutant p.I236N a une activité résiduelle presque nulle (1± 0.7% pour la 17-OHP et 2.4±1.4% pour la

progestérone). En revanche la troisième substitution, p. M239K ne réduit pas significativement la conversion du substrat. Elle laisse persister une activité résiduelle de 95.4±24.7% pour la 17-OHP et de 97.7±7.7% pour la progestérone comparée avec l'activité du CYP21 normal.

b) Mutation p. R356W dans l'exon 8

Cette mutation a été trouvée chez des patients porteurs d'une forme classique avec ou sans perte de sel clinique. Elle abolit l'activité enzymatique de la 21-hydroxylase *in vitro* (Chiou et al., 1990). Cet arginine appartient au domaine 338-361 décrit comme potentiellement impliqué dans l'oxydo-réduction (Lajic et al., 1997b).

B/ Activité de 1-5% : Mutation p.I172N dans l'exon 4

Cette mutation a été mise en évidence pour la première fois chez un patient porteur d'une forme virilisante pure (Amor et al., 1988). D'après des études *in vitro*, la protéine mutée est bien liée au réticulum endoplasmique, mais elle subit un changement de conformation entraînant une stabilité moins grande et modifiant ses propriétés cinétiques (diminution de la *Vmax* de l'enzyme) (Hsu et al., 1996). L'activité enzymatique a été estimée entre 1 et 10 % selon les publications (Chiou et al., 1990), (Hsu et al., 1996).

C/ Activité modérée

a) Mutation p.P30L dans l'exon 1

Les cytochromes P450 possèdent une extrémité amino-terminale riche en acides aminés hydrophobes suivis par au moins deux résidus proline ; la succession de ces acides aminés semble nécessaire à l'ancrage du cytochrome au niveau de la membrane microsomale du réticulum endoplasmique lisse (Tusie-Luna et al., 1991).

b) Mutation p.V281L dans l'exon 7

Des études fonctionnelles ont montré que la mutation diminue la V_{max} de l'enzyme affectant la structure secondaire de la protéine avec une perturbation structurale (Tusie-Luna et al., 1990), (Wu and Chung, 1991). L'activité enzymatique résiduelle est de 10 à 20 % selon certains auteurs (Tusie-Luna et al., 1990) tandis qu'elle a été trouvée entre 20 % pour la progestérone et 50 % pour la 17-OHP par d'autres (Wu and Chung, 1991).

c) Mutation p.P453S dans l'exon 10

La Proline 453 situé dans la partie C-terminale est bien conservée entre les différentes espèces, moins entre les cytochromes stéroïdogéniques et ceux des autres mammifères, le remplacement de la proline par une sérine polaire pourrait augmenter la flexibilité structurale de la protéine et donc diminuer sa stabilité.

2.2. Mutations ponctuelles situées dans les introns

La mutation IVS2-13A/C>G dans l'intron 2 est la mutation intronique la plus fréquente dans la 21-hydroxylase et aussi la mutation ponctuelle la plus fréquente (20% des allèles). Elle ne touche pas les sites consensus habituels. Les études de Higashi (Higashi and Fujii-Kuriyama, 1991) ont même montré que malgré l'apparition d'un nouveau site accepteur CAG le mécanisme pathogène de cette mutation est beaucoup plus complexe car un troisième site accepteur est utilisé entraînant un décalage de cadre de lecture et une protéine non fonctionnelle.

3. Association de plusieurs mutations dérivées du pseudogène

L'association de plusieurs mutations sur le même allèle a été décrite, mutations qui existent dans la séquence du pseudogène exceptée la mutation p.P453S. Ces différentes associations sont décrites dans le tableau 2.

TABLEAU 2 : Association de plusieurs mutations ponctuelles du gène *CYP21A2*

Changement de nucléotides	Nom	Phénotype	Référence bibliographique
-126C>T ; -113G>A ; -110T>C ; -103A>G	Mutation promoteur	NC ?	(Bristow et al., 1993), (Baralle and Baralle, 2005)
IVS2-13A/C>G ; c.841G>T	Mutation intron 2, p.V281L	SW	(Wedell et al., 1994)
c.515T>A ; c.707 T>A ; c.710 T>A ; c. 716 T>A c.841G>T ; c.920dupT	p.I172N, triple mutation, p.V281L, p.L307fs	SW	(Wedell et al., 1994)
c.707 T>A ; c.710 T>A ; c. 716 T>A ; c.841G>T	Triple mutation, p.V281L	SW	(Wedell et al., 1994)
c.920dupT ; 952 C>T	p.L307fs, p.Q318X	SW	(Wedell et al., 1994)
c.952C>T ; c.1066 C>T	p.Q318X; p.R356W	SW	(Wedell et al., 1994)
c.515T>A ; c.707 T>A ; c.710 T>A ; c. 716 T>A c.841G>T ; c.920dupT c.952 C>T ; c.1066 C>T	p.I172N, triple mutation, p.V281L, p.L307fs p.Q318X, p.R356W	SW	(Jaaskelainen et al., 1997)
c.515T>A ; c.1357 C>T	p.I172N, p.P453S	SV	(Jaaskelainen et al., 1997)
IVS2-13A/C>G; c.515T>A	Mutation intron 2, p.I172N	SW	(Lajic et al., 1997a)
c.841G>T ; c.920_921 insT	p.V281L, p.L307fs	SW	(Lajic et al., 1997a)
c.841G>T ; c.952 C>T; c.1066 C>T	p.V281L, p.Q318X, p.R356W	SW	(Ohlsson et al., 1999)
IVS2-13A/C>G; c.952 C>T	Mutation intron 2, p.Q318X	SW	(Wedell et al., 1994)

Toutes ces mutations ponctuelles (figure 17) ont déjà été décrites de façon isolée, sauf la quadruple substitution nucléotidique située dans la région promotrice du gène. Lors de la comparaison des produits de transcription des gènes *CYP21A2* et *CYP21A1P*, l'activité transcriptionnelle du gène fonctionnel a été trouvée 5 fois supérieure à celle du pseudogène ; ce phénomène est dû au changement de 4 nucléotides situés en position -126, -113, -110 et -103 par rapport au site d'initiation de la traduction. Ces nucléotides sont impliqués dans la liaison à des facteurs protéiques de transcription dont le facteur Sp1 (Baralle and Baralle, 2005). Le retentissement de ces substitutions n'a pas été étudié *in vitro* sur l'activité enzymatique 21-hydroxylase mais sur l'expression d'un gène rapporteur qui est de 20 % par rapport à l'expression normale.

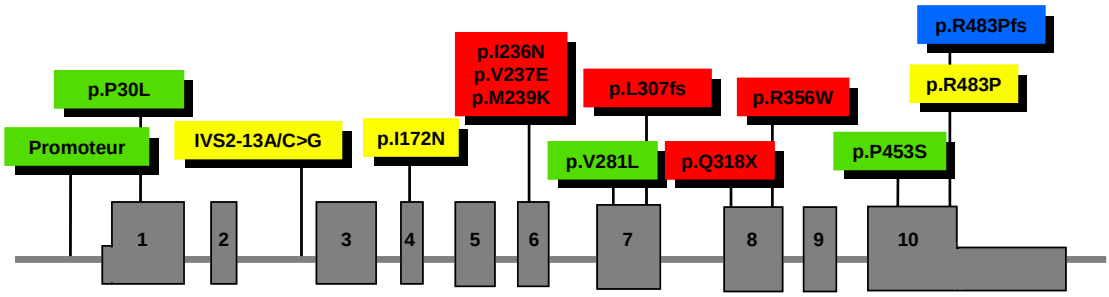


FIGURE 17 : Mutations ponctuelles les plus fréquentes du gène *CYP21A2*

La couleur attribuée à chaque mutation correspond à la sévérité évaluée par des études in vitro
Rouge : abolition ; Jaune : faible entre 2 et 10 % ; Vert : 20 à 50 % ; Bleu : non testée.

4. Mutations plus rares décrites dans la littérature

Absentes de la séquence du pseudogène et rarement identifiées, ces mutations rares rapportées à ce jour dans la littérature sont présentées dans le tableau 3. Elles représentent 94 mutations pour 151 patients.

TABLEAU 3 : Mutations ponctuelles rares du gène *CYP21A2*

Changement de nucléotides	Nom	Nombre de patients	Phénotype	Activité 17-OHP/P	Références bibliographiques
c.3G>A	p.M1I	1	SW	-	(Usui et al., 2004)
c.56G>A	p.W19X	1	SW	-	(Kharrat et al., 2004)
c.66G>A	p.W22X	1	SW	-	(Lajic and Wedell, 1996)
c. 64_65 insT	p.W22fs	1	SW	-	(Ezquieta et al., 1999)
c. 82_83 insC	p.H28fs	1	SW	-	(Lau et al., 2001)
c.89 C>A	p.P30Q	1	SW	0,2%/0%	(Lajic et al., 1999)
c. 126 _127delC	p.P42fs	1	-	-	(Zeng et al., 2004)
c. 141delT	p.L48fs	1	-	-	(Krone et al., 1999)
c.185A>T	p.H62L	4	NC	44.5%/20.7%	(Pinto et al., 2003), (Soardi et al., 2008)
c.191G>A	p.G64E	1	SW	Aucune	(Ohlsson et al., 1999)

Changement de nucléotides	Nom	Nombre de patients	Phénotype	Activité 17-OHP/P	Références bibliographiques
IVS1-2A>G	site accepteur I 1	1	SW	-	(Lajic and Wedell, 1996)
c.220A>T	p.K74X	1	SW	-	(Nunez et al., 1999)
c.230T>C	p.I77T	1	SV	3%/5%	(Krone et al., 2005a)
c.268G>T	p.G90V	1	SW	Aucune	(Lobato et al., 1999), (Nunez et al., 1999)
IVS2+1G>A	site donneur I 2	2	SW	-	(Lee et al., 1998)
IVS2+5G>T	Site donneur I2	1	-	-	(Friaes et al., 2006)
c.291C>A	p.Y97X	1	SW	-	(Krone et al., 1998)
c.314 C>T	p.P105L p.P105L+p.P453S	2	NC	62%/64% 10%/7%	(Wedell et al., 1992), (Nikoshkov et al., 1997)
c.356A>G	p.H119R	1	NC	31.6%/32.5%	(Concolino et al., 2009a)
c.364A>C	p.K121Q	1		14%/19.5%	(Riepe et al., 2008)
c.371G>A	p.R124H	1	NC	-	(Usui et al., 2004)
c.416T>A	p.V139E	1	SW	-	(Robins et al., 2006)
c.439T>C	p.C147R	1	NC/SV	-	(Robins et al., 2006)
c.497T>C	p.L166P	1	-	0.3 %/0.4 %	(Robins et al., 2006)
c.505_506delTGinsA	p.C169fs	1	SW	-	(Witchel et al., 1999)
c.505T>C	p.C169R	1	SV	-	(Grischuk et al., 2006)
c.508_509insA	p.S170fs	6	SW		(Billerbeck et al., 2002), (Zeng et al., 2004)
c.512 T>A	p.I171N	1	-	0.7%/0.6%	(Balsamo et al., 2000), (Barbaro et al., 2006)
c.533G>C	p.G178A	1	SV	19%/0%	(Lobato et al., 1999), (Nunez et al., 1999)
c.532G>A	p.G178R	1	SW	0.4%/0.0%	(Grischuk et al., 2006)
c.549 delC	p.D183fs	1	SW	-	(Stikkelbroeck et al., 2003)
c.581T>A	p.I194N	1	-	33.2%/46.7%	(Concolino et al., 2009a)
c. 587_589delAGG	DelE196	1	-	6%/23%	(Nikoshkov et al., 1998)
c.631G>C	p.V211L	1	Normal ?	-	(Speiser et al., 1988)
c. 636_637ins T	p.P213fs	1	SW	-	(Usui et al., 2004)
c.670C>T	p.R224W	1	-	51.9%/45.6%	(Concolino et al., 2009b)
c.682C>T	p.Q228X	1	SW	-	(Ezquieta et al., 2002a)
c.697A>G	p.R233G	1	NC	-	(Robins et al., 2006)
c.737 delA	p.E246fs	1	SW	-	(Koyama et al., 2002)
c.782T>C	p.L261P	1	SW	-	(Loke et al., 2001)
c.784C>T	p.Q262X	1	SW	-	(Ohlsson et al., 1999)
c.842T>G	p.V281G	1	SV	-	(Krone et al., 2000)
c.847A>C	p.M283L	1	NC	-	(Ezquieta et al., 2002b)
c.871G>T	p.G292C	1	SW	Aucune	(Lobato et al., 1999), (Nunez et al., 1999)
c.871G>C	p.G291R	1	-	-	(Stikkelbroeck et al., 2003)
c. 871G>A	p.G291S	3	SW	0.8%/0.8%	(Wedell et al., 1992),(Nikoshkov et al., 1998), (Bachega et al., 1998)
c.884C>A	p.T295N	1	SV/SW	-	(Robins et al., 2006)
c.898C>T	p.L300F	1	SV	-	(Krone et al., 2000)
c.902C>A	p.S301Y	3	NC	-	(Stikkelbroeck et al., 2003)
c.904T>C	p.W302R	1	SW	0.1%0.0%	(Grischuk et al., 2006)
c.906G>A	p.W302X	1	SW	-	(Jaaskelainen et al., 1997)
IVS7+1G>T	site donneur I 7	1	SW	-	(Wedell, 1998)
IVS7+2T>G	site donneur I 7	1	SW	-	(Ordonez-Sanchez et al., 1998)

Changement de nucléotides	Nom	Nombre de patients	Phénotype	Activité 17-OHP/P	Références bibliographiques
c. 910 G>A	p.V304M	1	NC	46%/26%	(Lajic et al., 2002)
c.922C>T	p.L308F	1	SV	-	(Robins et al., 2006)
c.943C>T	p.Q315X	1	-	-	(Dolzan et al., 2005)
c.946C>T	p.R316X	2	SW	-	(Lee et al., 1998)
c.949C>A	p.L317M	1	NC	-	(Deneux et al., 2001)
c.958G>A	p.E320K	1	SV	-	(Pinto et al., 2003)
c.988_997delTCCAGCC	p.S330fs	1	SW	-	(Lee et al., 1998)
c.1022G>C	p.R341P	6	NC/SV	0.7%/0.7%	(Pinto et al., 2003), (Barbaro et al., 2006)
c.1051G>A	p.E351K	1	SV	-	(Krone et al., 2005b)
c.1060C>T	p.R354C	1	SW	-	(Krone et al., 2000)
c.1061G>A	p.R354H	1	SW	Aucune	(Lobato et al., 1999), (Nunez et al., 1999)
c.1067G>C	p.R356P	1	SW	0,15%/0,15%	(Lajic et al., 1997a)
c.1067G>A	p.R356Q	1	SV	0,65%/1,1%	(Lajic et al., 1997a)
c.1185C>T	p.A362V	2	SW	Aucune	(Ohlsson et al., 1999)
c.1088T>G	p.L363W	2	SV	-	(Levo and Partanen, 2001)
c.1093C>T	p.H365Y	4	SV/SW	-	(Zeng et al., 2004), (Friaes et al., 2006) , (Jeske et al., 2009)
c.1096C>T	p.R366C	1	-	-	(Robins et al., 2006)
c.1123G>A	p.G375S	1	SW	<1%/<1%	(Lajic et al., 2002)
c.1128C>A	p.Y376X	1	SW	-	(Stikkelbroeck et al., 2003)
c.1140G>C	p.E380D	1	SW?	30 %	(Kirby-Keyser et al., 1997), (Hsu et al., 1999)
c.1171G>A	p.A391T	1	-	38%/23%	(Robins et al., 2007)
c.1175_1190dupl CCTGGATGAGACGGTC	p.V397fs	1	SW	-	(Lee et al., 1998)
c.1214G>A	p.W405X	1	SW	-	(Wedell and Luthman, 1993b)
c.1219G>A	p.D407N	1	-	72.7%/73.6%	(Concolino et al., 2009b)
c.1222C>T	p.R408C	10	SW	1.3%/0.6%	(Billerbeck et al., 2002), (Soardi et al., 2008)
c.1270G>A	p.G424S	12	SV	-	(Billerbeck et al., 1999), (Friaes et al., 2006)
c.1276C>T	p.R426C	1	-	0%/0%	(Grischuk et al., 2006)
c.1277G>A	p.R426H	4	SV-SW	0.5%/0.4%	(Baumgartner-Parzer et al., 2001), (Barbaro et al., 2006)
c.1301C>T	p.A434V	1	SV	14%/12%	(Krone et al., 2005b)
c.1303C>T	p.R435C	1	NC	-	(Deneux et al., 2001)
c.1330C>T	p.R444X	1	SW	-	(Friaes et al., 2006)
c.1337T>C	p.L446P	1	SV-SW	0.5%/0.0%	(Barbaro et al., 2006)
c.1419G>T	p.M473I	1	N/NC	-	(Robins et al., 2006)
c.1426delT	p.P475fs	1	-	-	(Ordonez-Sanchez et al., 1998)
c.1436G>T	p.R479L	1	-	76%/80%	(Zeng et al., 2004), (Robins et al., 2007)
c.1442A>C	p.Q481P	1	SW	-	(Di Pasquale et al., 2005)
c.1444C>T	p.P482S	8 (dont 3 HTZ)	NC	-	(Balsamo et al., 2000), (Barbaro et al., 2004) (Di Pasquale et al., 2005)
c.1448G>C	p.R483P	2	-	1.0/2.2%	(Wedell and Luthman, 1993a), (Nikoshkov et al., 1998)
c.1448G>A	p.R483Q	2	NC	1.1%/3.8%	(Stikkelbroeck et al., 2003), (Robins et al., 2007)
c.1447_1448 ins C	p.R483fs	1	SW	-	(Wedell et al., 1992)
c.1447C>T	p.R483W	1	SW	-	(Kharrat et al., 2004)

La protéine CYP21 est le cytochrome P450 avec le plus grand nombre de mutations décrites. La répercussion *in vitro* est connue pour la plupart d'entre elles, offrant des informations sur les résidus importants pour la fonction enzymatique http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm.

Les études structurales commencent à être réalisées systématiquement pour chaque nouvelle mutation étudiée *in vitro* afin de tenter d'expliquer les effets sur la structure de la protéine.

MATERIEL ET METHODES

I. Etude moléculaire des patients

La démarche adoptée dans le laboratoire pour l'étude génétique des patients est la suivante : l'étude des données cliniques et des résultats des dosages hormonaux effectués par les cliniciens, permet le diagnostic et oriente l'étude génétique vers le gène responsable de la pathologie. L'exploration des sujets repose sur une amplification spécifique du gène par méthode PCR suivie du séquençage du gène grâce à un séquenceur capillaire après avoir obtenu le consentement des individus. L'ADN génomique est extrait des leucocytes sanguins dont le noyau renferme le patrimoine génétique. L'ADN peut également provenir d'une biopsie de trophoblastes ou de cultures d'amniocytes en cas de diagnostic prénatal.

1. Préparation des échantillons

Les échantillons d'ADN sont extraits à partir des prélèvements de sang total, obtenus après que les familles ont signé un consentement éclairé pour étude génétique. Le sang est récupéré dans un tube à numération formule sanguine ou tube à complexon (tube EDTA). Le sang est centrifugé pour séparer les cellules du plasma qui peut éventuellement être utilisé pour les dosages hormonaux. Une lyse des globules rouges permet d'isoler les leucocytes à partir desquels l'ADN génomique est extrait avec le kit «Nucléon BACC3 - Amersham biosciences».

La stratégie d'exploration du gène *CYP21A2* consiste à l'amplifier en plusieurs fragments d'une façon spécifique sans amplifier le pseudogène, réservoir des lésions. Trois étapes sont nécessaires pour détecter les mutations: extraction de l'ADN, amplification du gène *CYP21A2* et séquençage.

2. Amplification du gène *CYP21A2*

2.1. Principe de la technique

L'amplification est réalisée par méthode de PCR ou Polymerase Chain Reaction. Des oligonucléotides, appelés aussi amorces ou primers, sont choisis de façon à s'hybrider d'une façon spécifique, chacun à un brin d'ADN et à entourer la région à amplifier. Une fois l'oligonucléotide fixé, une ADN polymérase peut synthétiser le fragment de 5' en 3' en utilisant comme matrice le brin d'ADN auquel est fixé l'amorce et en incorporant des dNTPs . Les brins d'ADN néosynthétisés serviront à leur tour de matrice pour le cycle suivant d'amplification.

La réaction comporte trois étapes qui se dérouleront à des températures différentes de façon cyclique ; dénaturation de l'ADN à 94°C, hybridation des amorces sur l'ADN simple brin

à une température adéquate et enfin l'extension à 72°C par la Taq polymérase va permettre la synthèse de l'ADN (figure 18).

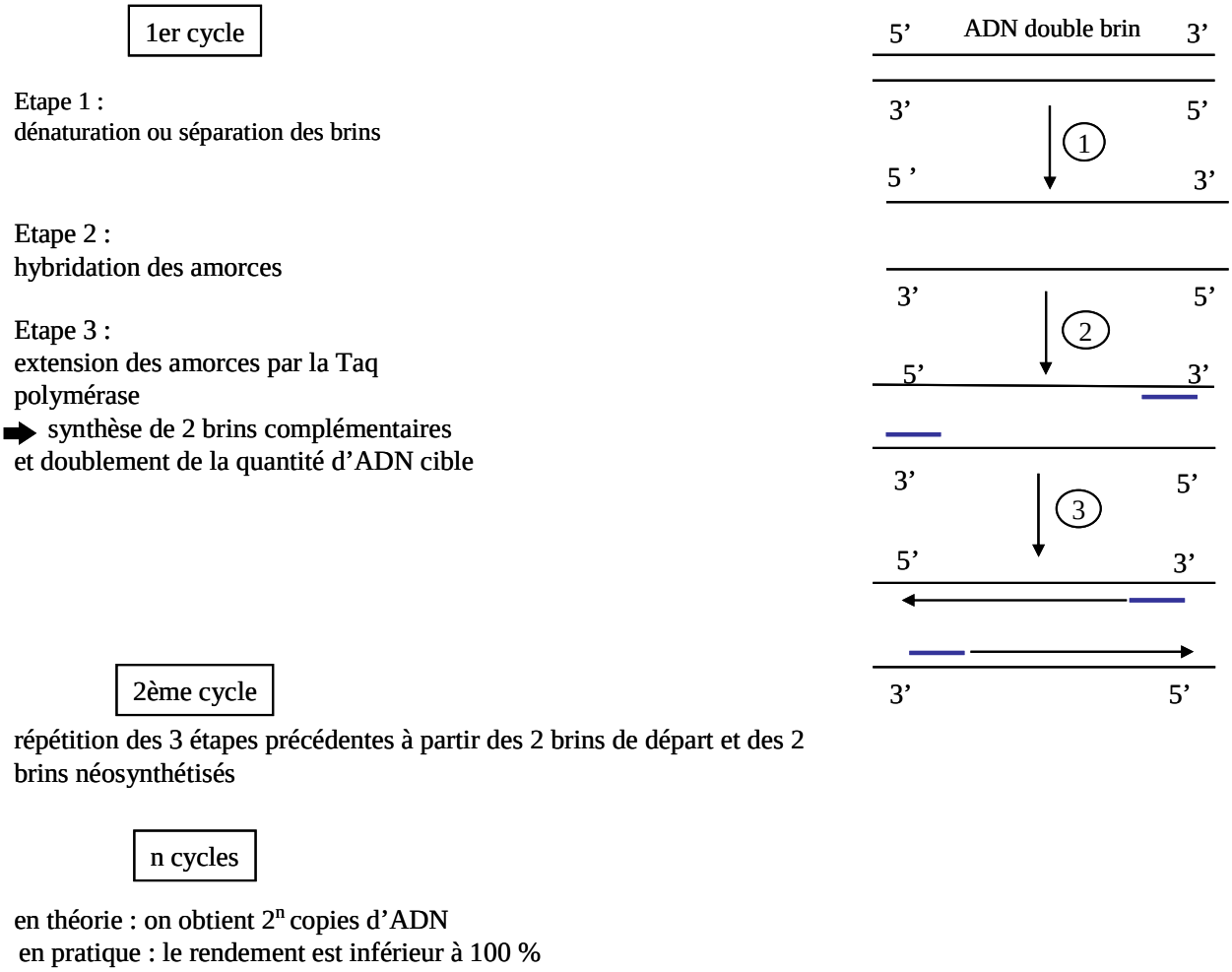


FIGURE 18 : Amplification par méthode PCR

2.2. Conditions d'amplification

Le mélange réactionnel de la PCR contient :

- Taq polymérase : Q-BIOgene® qui est à la concentration de 5 U/µl et 0.625 U par réaction sont nécessaires.

- Tampon de la Taq polymérase livré avec l'enzyme par Q-BIOgene® (10X). La concentration nécessaire pour la réaction est 1X.

- Chlorure de magnésium $MgCl_2$. Sa concentration est recommandée entre 1 et 3 mM. La solution mère à 50 mM, est par commodité, diluée au 1/5 soit à la concentration de 10 mM.

- Amorces oligonucléotidiques (Eurogentec®) ; 100 ng sont utilisés par réaction de PCR (tableau 4).

- Désoxyribonucléosides triphosphates ou dNTP (Eurobio) commercialisés sous forme d'une solution mère renfermant les 4 dNTPs. La concentration finale de chaque dNTP est de 200 µM par réaction de PCR.

- Diméthyl sulfoxyde ou DMSO (sigma) augmente la spécificité d'hybridation de l'amorce et déstabilise les structures secondaires formées par les régions riches en GC ; concentration à 5% par réaction de PCR.

- La matrice ADN double brin (50 à 200 ng/µl par réaction) correspondant à l'ADN du pateint

- Eau qsp 50µl.

TABLEAU 4 : Couples d'amorces utilisés pour la PCR

Fragment amplifié	Amorce sens	Amorce anti-sens
1- 5'UTR-exon 3	**-400 (non spécifique)** GGCAAACCAGGCTTAAACTGTAT	**3R (spécifique)** GGCTTTCCAGAGCAGGGAGTAGTC
2- Exon 3-3'UTRprox	**3F (spécifique)** CCGGACCTGTCCTTGGGAGAACTACT	**10R proximal (non spécifique)** CTGAGGTACCCGGCTGGCATCGGT
3-Exon 3-3'UTRdistal	**3F (spécifique)** CCGGACCTGTCCTTGGGAGAACTACT	**10R distal (non spécifique)** CGATCTCGCAGCACTGTTTTACAG
4-Exon 3-3' UTRend	**3F (spécifique)** CCGGACCTGTCCTTGGGAGAACTACT	**10Rend** post **AATAAA (non spécifique)** AGTGTAACAGGCAAGGGACTGAGC
5-Intron 2-Exon 6	**Int2F (spécifique)** AGGTCAGGCCCTCAGCTGCCTTCA	**6RPCR (non spécifique)** GCCTCAGCTGCATCTCCACGATGTG
6-5'UTR-Exon 3 commun	**-400 (non spécifique)** GGCAAACCAGGCTTAAACTGTAT	**CYP21+21P 3R (non spécifique)** CCTTACCTCACAGAACTCCT

En première intention, on amplifie les fragments 1, 2 et 5 qui permettent de couvrir tout le gène. Il faut amplifier le fragment 2 pour rechercher la délétion de 8pb et explorer la partie de l'exon 3 sous l'amorce utilisée pour les autres fragments.

Le fragment 6 est amplifié en cas de non amplification des autres fragments à la recherche d'une large lésion du gène (tableau 4).

2.3. Vérification et purification des produits PCR

Avant l'année dernière les produits de PCR étaient vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (SIGMA, St Louis MO, USA) 1%. Les bandes d'ADN sont révélées grâce au bromure d'éthidium (abrégé BET, commercialisé par SIGMA, St Louis MO, USA), agent intercalant fluorescent sous ultra violet. L'estimation de la taille du fragment est possible en comparant sa distance de migration à celles des bandes d'un marqueur de poids moléculaire PM2 (ADN du bactériophage PM2 digéré par l'enzyme de restriction Hind III commercialisés par Boehringer Mannheim, Allemagne).

En pratique, 10% du produit PCR ou 10 µl de PM2 à 50 ng/µl sont mélangés à 3µl de solution de dépôt (Dye-blue) et déposés dans les puits.

Depuis 2007, les produits de PCR sont vérifiés et quantifiés à l'aide du LabChip90 (CALIPER®). Une fois vérifiées, les PCR sont purifiées afin d'éliminer les réactifs qui n'ont pas été incorporés lors de la réaction de PCR (sels, amorces et dNTP) et qui peuvent altérer la qualité de la réaction de séquence ultérieure. La technique utilisée est celle des plaques Montage $PCR_{\mu 96}$ MILLIPORE®.

Cette technique consiste à filtrer tous les réactifs non incorporés et à récupérer l'échantillon contenant les fragments de PCR qu'on transfère dans des tubes.

Les échantillons peuvent être conservés quelques jours à +4°C et plusieurs mois à -20°C.

3. Séquençage automatique

3.1. Principe de la technique

Cette méthode est basée sur l'incorporation des ddNTPs qui bloquent l'extension du fragment. En effet ils sont dépourvus de groupement hydroxyle en 3' donc ils ne peuvent pas former une liaison phosphodiester 3'→5'. Chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome différent.

(La qualité du séquençage est basée sur la proportion dNTP/ddNTP). La réaction comporte trois étapes qui se dérouleront à des températures différentes de façon cyclique; L'ADN bicaténaire est au préalable dénaturé à 96°C, puis une amorce va s'hybrider sur l'ADN simple brin à 50°C et enfin une extension est réalisée à 60°C.

Le mélange réactionnel utilisé est le « Big Dye Terminators versions v1.1 (BDT v1.1)» (Applied Biosystems®), et la migration électrophorétique des séquences est réalisée sur le séquenceur automatique ABI PRISM 3130.xls (16 capillaires) ou 3730 (48 capillaires). Après installation de la plaque (où on a déposé les produits de séquence purifiés) dans l'appareil, l'échantillon d'ADN va être injecté d'une façon électrocinétique, séparé par électrophorèse capillaire, illuminé par un laser. La fluorescence ainsi émise par chaque ddNTP est collectée par une caméra CCD et restituée sous forme de chromatogrammes.

3.2. Amorces utilisées dans la réaction de séquence

Les amorces sont chois de façon à couvrir le fragment amplifié, il existe des amorces sens (F) et des amorces anti-sens (R) (tableau 5).

TABLEAU 5 : Amorces utilisées dans la réaction de séquence

Localisation	Sens	Nom usuel	Séquences 5'-3'
400	F	400	GGCAAACCAGGCTTAAACTGTAT
Taq 5'	F	Taq 5'	CCTTGCTTCTTGATGGGTGATCA
Taq 3'	R	Taq 3'	TGATCACCCATCAAGAAGCAAGG
Promoteur 5'	F	P5'	TCCCAAGGCCAATGAGACTGGTGT
Ext5'non codante commune	F	30	AAGGTCAGGGTTGCATTTCC
Exon 3	R	31	CTTCTTGTGGGCTTTCCAGAGCAG
Intron 1	F	Int1F	TCTCGCTCTGGCCCTCACCATA
Exon 1	F	1F	CCCGCCTGCTGTGGAACTGG
Intron 1	R	1R	ACCTCCGCCCCCTCCTATGGTGA
Exon 3	R	3R	GGCTTTCCAGAGCAGGGAGTAGTC
Intron 2	F	2F	AGGTCAGGCCCTCAGCTGCCTTCA
Intron 4	R	4R	AGTTCAGGACAAGGAGAGGCTCAGGGA
Intron 4	F	5F	TGAGCCTCTCCTTGTCCTGAACT
Intron 5	R	5R	GAACTGCGGCAGGAAGCATGAGA
Intron 5	F	6F	GGACCTGGAGCCTAGACACCC
Intron 6	R	6R Seq	CATAACTGGGGTATGCAAAA
Intron 6	F	7F	GCCTCAGCATTGCTATGAGGCG
Intron 7	R	7R	CACAGTGCTCAGAGCTGAGT
Intron 7	F	8F	GCACTCAGGCTCACTGGGTTGC
Intron 8	R	8R	TGGGCTCGGGCTTTCCTCACTCATCC
Intron 8	F	9F	GATGAGTGAGGAAAGCCCGAG
Intron 9	R	9R	GGGTGGGGAGGCGTTCAGCGGCAGCGG
Intron 9	F	10F	CTGGTCCCCGCTGCCGCTGAACGCC
3'UTR	R	10R distal	CGATCTCGCAGCACTGTGTTTACAG
3'UTR	R	10R	AGTGTAACAGGCAAGGGACTGAGC
3'UTR	R	10R proximal	CTGAGGTACCCGGCTGGCATCGGT

3.3. Conditions de séquençage

Dans chaque tube de la réaction de séquence, il faut mettre, un mix de séquence, du produit de PCR purifié et amorce sens ou anti-sens (tableau 6).

TABLEAU 6 : Conditions de séquençage

Réactif	Quantité
Produit PCR	6 ng par réaction
Amorce (50 ng/µl)	1µl (50ng)
Mix	8µl

Mix par réaction :

Big Dye® Terminator v1.1 0.5 µl
Tampon 5X 1.75 µl
Eau milliQ qsp 8 µl 5.75 µl

Les produits de séquence sont purifiés sur plaques Millipore® qui retiennent les séquences nucléotidiques > 20 pb remobilisés par ajout de solution d'injection suivi par une agitation ; puis les produits de séquence purifiés sont déposés dans une plaque sur le séquenceur ABI (3130.xls et 3730).

II. Etude fonctionnelle du CYP21

A partir d'un plasmide contenant l'ADNc normal de la protéine, la mutation est introduite par mutagenèse dirigée. Ensuite le plasmide normal et le plasmide contenant la mutation sont transfectés dans des cellules eucaryotes. La fonction de la protéine CYP21 est étudiée par estimation de son activité enzymatique en comparaison avec la protéine normale ou wild-type (WT) après incubation des précurseurs, Progestérone et 17-OHP tritiés. La constante de Michaelis et Menten Km ainsi que la vitesse maximale Vmax sont déterminées pour les mutants avec une activité enzymatique mesurable. Les études sont réalisées grâce au plasmide pCMV4 obtenu du Dr Bon-Chu CHUNG qui comporte l'ADNc (2Kb) du gène *CYP21A2* et le gène conférant la résistance à l'ampicilline (Hsu et al., 1996).

1. Fabrication des mutants par mutagenèse dirigée

1.1. Introduction de la mutation par PCR

1.1.1 Principe

Pendant longtemps, les méthodes de mutagenèse dirigée nécessitaient l'introduction d'une mutation dans un fragment d'ADN suivie d'une insertion dans un vecteur d'expression. Ces méthodes étaient lourdes car elles nécessitaient une reconstruction du plasmide avec les risques de liaison inversée ou de religation sans le fragment et des purifications du fragment muté.

Depuis 1996 (Braman et al., 1996), il est possible d'introduire directement la mutation dans un vecteur d'expression contenant l'ADNc d'intérêt. Cette méthode, résumée sur la figure 19 et réalisable avec le kit « Quickchange site Directed Mutagenesis » (Stratagene, La Jolla, Californie, USA).

La mutation est introduite dans le plasmide recombinant grâce à deux amorces complémentaires l'une de l'autre et contenant la séquence correspondant à la mutation. Une fois que ces amorces sont hybridées, une polymérase particulière, la Pfu polymérase, permet d'amplifier le plasmide entier sous sa forme mutée avec 12 fois moins d'erreurs que la Taq polymérase grâce à son activité 3'-5' exonucléasique (tableau 7).

L'efficacité de la mutagenèse dirigée est vérifiée à l'aide du plasmide pWhitescript ; dans ce plasmide se trouve le gène de la β-galactosidase contenant une mutation non-sens. Si la réaction de mutagenèse est effective, ce plasmide va être démuté et ainsi permettre l'expression de la β-galactosidase; le substrat X-Gal qui est ajouté au milieu lors de l'étape de transformation des bactéries pourra être métabolisé et les colonies deviendront bleues.

Après amplification, le brin parental du plasmide recombinant, non muté, est digéré par l'enzyme Dpn I (séquence cible : 5'-G^m ATC-3') qui est spécifique des ADN méthylés. Le brin néosynthétisé n'étant pas méthylé, ceci permet de récupérer uniquement le plasmide muté.

1.1.2 Protocole

L'introduction de la mutation dans l'ADNc est réalisée par méthode PCR (tableau 7). L'appareil utilisé est le thermocycleur 9600 (Applied Biosystems) ou le 9700 (Applied Biosystems) qui sont programmés pour une première dénaturation à 95°C pendant 30 secondes suivie de 12 cycles (une dénaturation de 30 secondes à 95°C; hybridation d'1 minute à 55°C et enfin une extension de 12 minutes à 68 °C nécessaire pour l'élongation complète du plasmide).

- *Conditions du choix des amorces.*

Plusieurs critères doivent être pris en compte lors de la détermination des amorces :

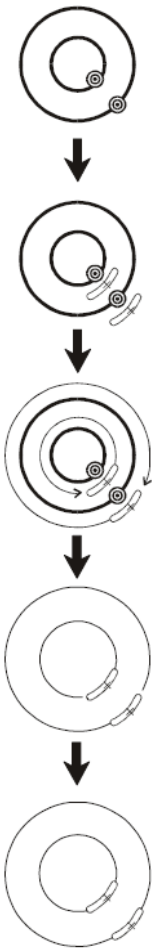
- Chaque couple d'amorces doit hybrider la même séquence sur le brin opposé.
- La taille des amorces doit être comprise entre 25 et 45 bases.
- La mutation doit être le plus possible au centre de l'amorce avec 10 à 15 bases de chaque côté.
- Le pourcentage en GC doit être supérieur à 40%.
- L'amorce doit se terminer par un G ou un C.

TABLEAU 7 : Conditions d'introduction de la mutation dans l'ADNc

Réactifs	**Quantité**
Plasmide recombinant	5 à 50 ng
Amorce sens	125 ng
Amorce anti-sens	125 ng
dNTPs	1 µL
Tampon 10X (contenant 20 mM de $MgCl_2$)	5 µL
Pfu polymérase (2,5 U/µl)	1 µL
H_2O	qsp 50 µl

- *Elimination du brin parental.*

Le produit PCR est digéré par l'enzyme Dpn I (séquence cible : 5'-G^mATC-3') afin d'éliminer le brin parental méthylé (le plasmide pCMV4 est un plasmide bactérien, donc méthylé) contrairement au plasmide muté produit par PCR. Pour se faire, 1 µl d'enzyme à 10 U/µl est directement ajouté au produit PCR et mis à incuber 1 heure à 37°C.



Dénaturation de l'ADNc incorporé pour une hybridation ultérieure des deux amorces complémentaires des deux brins opposés.

Hybridation et extension des deux amorces contenant la mutation permettant d'avoir deux brins circulaires nichés.

Digestion de l'ADN parental non muté et méthylé avec l'enzyme Dpn1 tout en gardant le plasmide muté.

Transformation des bactéries E.coli XL1-Blue avec le plasmide et obtention d'un plasmide muté non niché prêt à être exprimé dans des cellules eucaryotes.

FIGURE 19 : Construction du plasmide muté

1.1.3. Oligonucléotides utilisés pour l'introduction des mutations

Les amorces utilisées pour introduire chaque mutation sont indiquées dans le tableau 8.

TABLEAU 8 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée données dans le sens 5' - 3' ; F: sens, R : anti-sens. La lettre en gras correspond à la base mutée.

Mutations	Oligonucléotides
p.P30L (contrôle)	F : CCGGAGCCTCCACCTCC**T**GCCTCTTGCCCCGGGCTTC
(c.89C>T)	R : GAAGCCCGGGGCAAGAGGC**A**GGAGGTGGAGGCTCCGG
p.I172N (contrôle)	F : CACCTGCAGCATCA**A**CTGTTACCTCACCTTCGG
(c.515T>A)	R : CCGAAGGTGAGGTAACAG**T**TGATGCTGCAGGTG
p.V281L (contrôle)	F : GGAAGGGCAC**T**TGCACATGGCTGCAGTGGACC
(c.841G>T)	R : GGTCCACTGCAGCCATGTGCA**A**GTGCCCTTCC

p.Q318X (contrôle) (c.952C>T)	F : ATTCAGCAGCGACTG**T**AGGAGGAGCTAGACCAC R : GTGGTCTAGCTCCTCCT**A**CAGTCGCTGCTGAAT
p.P453S (contrôle) (c.1357C>T)	F : CCTTCACGCTGCTGTCC**T**CCGGGGACGCCCTGCCCTCC R : GGAGGGCAGGGCGTCCCCGG**A**GGACAGCAGCGTGAAGG
p.H38L (c.113A>T)	F: CGGGCTTCTTGC**T**CCTGCTGCAGCCCGACC R: GGTCGGGCTGCAGCAGG**A**GCAAGAAGCCCG
p.H62L (c.185C>T)	F : CCATCTACAGGCTCC**T**CCTTGGGCTGCAAG R : CTTGCAGCCCAAGG**A**GGAGCCTGTAGATGG
p.L167P (c.500 T>C)	F : GAATTCTCTCTCC**C**CACCTGCAGCATCATCTG R : CAGATGATGCTGCAGGTG**G**GGAGAGAGAATTC
p.G178R (c.532G>A)	F : GTTACCTCACCTTC**A**GAGACAAGATCAAGG R : CCTTGATCTTGTCTCT**T**GAAGGTGAGGTAAC
p.I230T (c.689T>C)	F : GAAGCAGGCCA**C**AGAGAAGAGGGATCACATCG R : CGATGTGATCCCTCTTCTCT**G**TGGCCTGCTTC
p.R233K (c.698G>A)	F : GGCTGAAGCAGGCCATAGAGAAGA**A**GGATCACATCG R : CGATGTGATCC**T**TCTTCTCTATGGCCTGCTTCAGCC
p.Y259H (c.775T>C)	F : GACATGATGGAC**C**ACATGCTCCAAGGGGTGGC R : GCCACCCCTTGGAGCATGT**G**GTCCATCATGTC
p.G292D (c.875G>A)	F : CCTCCTGATCGGTG**A**CACTGAGACCACAGC R : GCTGTGGTCTCAGTG**T**CACCGATCAGGAGG
p.S301Y (c.902C>A)	F : GCAAACACCCTCT**A**CTGGGCCGTGGTTTTTTTGCTTC R : GAAGCAAAAAAACCACGGCCCAG**T**AGAGGGTGTTTGC
p.E320K (c.958G>A)	F: CGACTGCAGGAG**A**AGCTAGACCACGAACTGGG R : CCCAGTTCGTGGTCTAGCT**T**CTCCTGCAGTCG
p.R341P (c.1022G>C)	F : CAAGGACCGTGCAC**C**GCTGCCCTTGCTCAATG R : CATTGAGCAAGGGCAGC**G**GTGCACGGTCCTTG
p.R369W (c.1105C>T)	F : CACCGCACCACAT**T**GGCCCAGCAGCATCTCCGGC R : GCCGGAGATGCTGCTGGGCC**A**TGTGGTGCGGTG

p.R408C (c.1222C>T)	F : CATGAGTTCTGGCCTGAT**T**GCTTCCTGGAGCC R : GGCTCCAGGAAGC**A**ATCAGGCCAGAACTCATG
p.G424S (c.1270G>A)	F : GCTCTGGCCTTCGGCTGC**A**GTGCCCGCGTGTG R : CACACGCGGGCAC**T**GCAGCCGAAGGCCAGAGC

1.2. Réaction de transformation

Afin d'obtenir une grande quantité de plasmide recombinant muté, celui-ci est intégré dans les cellules supercompétentes Epicurian coli XL1 (fournies dans le kit « Quickchange site Directed mutagenesis »). La réaction de transformation est réalisée selon le procédé du choc thermique, technique rapide et efficace.

A côté des plasmides avec les différentes mutations à étudier, plusieurs plasmides contrôles sont également utilisés afin de contrôler l'efficacité des différentes étapes de la construction du plasmide muté :

- Le plasmide pWhitescript servant de contrôle d'efficacité de la mutagenèse dirigée ; le milieu de culture sur lequel est étalé ce plasmide contrôle, renfermant la β-galactosidase, est additionné d'IPTG 10mM, inducteur des promoteurs des gènes bactériens et de X-Gal 2% (substrat chromogène de la βGal). Les colonies contenant le gène βGal démuté pousseront bleues. Le pourcentage d'efficacité de la mutagenèse dirigée est ainsi estimé.

- le plasmide pUC18 renfermant aussi le gène de la β-galactosidase servant de contrôle de transformation. Le milieu de culture sur lequel est étalé ce plasmide est aussi additionné de l'IPTG 10mM, et de X-Gal 2%. Les colonies contenant pUC18 pousseront bleues. Le pourcentage d'efficacité de la transformation est ainsi estimé en comparant le nombre de colonies obtenues au nombre indiqué par le fournisseur.

Pour chaque réaction de transformation :

- Un volume de 50 µl de cellules est placé dans des tubes Falcon 2059 en propylène préalablement mis dans la glace.
- 1 µl de plasmide digéré par Dpn 1 est ajouté dans chaque tube, mélangé doucement pendant quelques secondes à température ambiante et incubé 30 minutes dans la glace.
- Le mélange est ensuite soumis à un choc thermique grâce à une incubation de 45 secondes à 42°C suivie par 2 minutes dans la glace. Ainsi les parois des bactéries deviennent perméables à 42°C ce qui permet au plasmide de rentrer. L'incubation dans la glace va refermer les parois.

- Dans chaque tube, 500 µl du milieu SOC (milieu de culture pour les bactéries) préalablement chauffé à 42°C, sont ajoutés et incubés 1 heure à 37 °C sous 200 rpm.
- Les milieux contenant le témoin négatif (milieu SOC et bactéries non transformées) et le plasmide étudié sont ensuite étalés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu LB-Agar supplémenté en ampicilline à la concentration finale de 100 µg/ml et mis à incuber une nuit dans un étuve à 37°C.

1.3. Sélection des clones contenant le plasmide d'intérêt

Après incubation une nuit à 37°C, les boîtes de Pétri contiennent de nombreuses colonies qui n'ont pas forcément intégré le plasmide avec la mutation. La poursuite de l'étude n'est possible qu'avec un plasmide recombinant possédant la mutation d'intérêt. Il faut donc vérifier que la technique de mutagenèse dirigée a été efficace par séquençage automatique après amplification.

- *Amplification sélective par méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction)*

L'appareil utilisé est le thermocycleur Eppendorf qui est programmé pour une première dénaturation à 94° C pendant 5 min, suivie de 30 cycles de dénaturation 30 sec à 94°C, hybridation 30 sec à 60°C, extension 2 min à 72°C avec une extension finale de 10 min à 72°C.

Ainsi plusieurs colonies sont prélevées et réparties directement dans des tubes contenant le mix de PCR. Pendant l'étape de dénaturation à 95°C, les bactéries sont dégradées et elles libèrent l'ADN.

Les amorces choisies pour amplifier l'ADNc sont localisées dans les partie 5' UTR et 3'UTR de l'ADNc du *CYP21A2*. Les séquences des amorces sont les suivantes :

- Amorce sens dans la partie 5' UTR : -5'- ACCGTCAGATCTCTAGCGATGCTG -3'
- Amorce antisens dans la partie 3' UTR : -5'- TCGCAGCACTGTGTTTACAG -3'

- *Vérification de l'intégration de la bonne mutation dans le plasmide par séquençage :*

Après vérification et purification des produits PCR, chaque ADNc d'environ 2Kb est entièrement séquencé.

-Mise au point

Pour la réaction de séquence, chaque tube contient :

- 1 µl de PCR purifiée

- 1 µl d'amorce sens ou anti-sens (50 ng/µl)
- 8 µl de mix contenant 0.5 µl de BDT v1.1, 1.75µltampon 5x et 5.75 µl H_2O milliQ

Pour séquencer tout l'ADNc, les amorces présentées dans le tableau 9 sont utilisées :

TABLEAU 9 : Amorces nucléotidiques utilisées pour le séquençage de l'ADNc (F : sens et R : antisens).

Noms des amorces	Oligonucléotides
E2-F	5'-GTGGTGCTGAACTCCAAGAGG-3'
E3-R	5'-GGCTTTCCAGAGCAGGGAGTAGTC-3'
E6-R	5'-GCCTCAGCTGCATCTCCACGATGTG-3'
E10-R	5'-TCGCAGCACTGTGTTTACAG-3'

Une fois les clones d'intérêt identifiés, ils sont amplifiés par mini et midi-culture pour avoir une quantité suffisante de plasmide muté prêt à être exprimé dans des cellules eucaryotes.

1.4. Préparation du plasmide d'intérêt

1.4.1 Miniculture

Le clone sélectionné est mis en culture 8 heures à 37°C sous 200 rpm dans 10 ml de milieu LB liquide supplémenté par 100 µg/ml d'ampicilline.

1.4.2 Midiculture

Les 10 ml du milieu de culture sont ajoutés à 100 ml de milieu LB à 100 µg/ml d'ampicilline et incubés la nuit à 37°C sous 200 rpm.

1.4.3 Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction du plasmide est réalisée grâce au kit « Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega) » basé sur la méthode de la lyse alcaline des cellules.

- Le milieu de culture est tout d'abord centrifugé 15 minutes à 7000 rpm à température ambiante.

- Le culot contenant les bactéries est repris dans 2 ml de solution de re-suspension (Tris-HCl, pH 7,5 50 mM, EDTA pH 8 10mM, RNase A 100µg/mL) puis lysé par ajout de 2 ml de solution de lyse des bactéries (NaOH 0,2 M et SDS 1%), agitation manuelle puis incubation pendant 3 minutes à température ambiante.

- Après ajout de 3,3 ml de solution de neutralisation (guanidine hydrochloride 4,09 M, acétate de potassium 759 mM et acide acétique glacial 2,12 M), l'ensemble est mélangé par

retournement et incubé 3 minutes à température ambiante jusqu'à formation d'un précipité blanc de débris cellulaires.

- Le lysat cellulaire est déposé dans une colonne de lavage, elle-même disposé dans un tube de 50 ml puis centrifugé pendant 5 minutes à 3000 rpm, température ambiante. Les déchets cellulaires sont retenus dans la colonne et l'éluat traverse la membrane de la colonne.

- Le lysat filtré est transféré sur une colonne de liaison et centrifugé 3 minutes à 3000 rpm. L'ADN plasmidique va se retrouver ainsi lié à la membrane de la colonne.

- Après élimination des contaminants, protéines, ARNs et endotoxines à l'aide de la solution Endotoxin Removal Wash et par une centrifugation de 3 minutes à 3000 rpm, l'ADN plasmidique est lavé par ajout d'une solution de lavage (acétate de potassium 60mM, Tris-HCl pH 7,5 8,3 mM, EDTA pH 8 0,04 mM et EtOH 60%) puis centrifugation 5 minutes à 3000 rpm et température ambiante.

- Enfin l'ADN plasmidique est élué par ajout de 600 µl d'eau nucléase free et une centrifugation de 5 minutes à 3000 rpm, température ambiante.

La qualité de la purification est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, les plasmides sont séquencés en intégralité et la quantification de l'ADN est réalisée par mesure de la densité optique à 260 nm.

2. Expression des protéines mutantes dans les cellules COS1 et détermination de leur activité enzymatique

2.1. Culture des cellules COS1

Pour étudier l'impact des nouvelles mutations faux-sens sur l'activité enzymatique du cytochrome CYP21, les cellules COS-1 (cellules de rein de singe transformées par le virus SV-40) sont utilisées pour réaliser l'étude fonctionnelle. Elles sont cultivées dans le milieu DMEM/F12 (1:1) complété avec un mélange antibiotique-antimycotique dilué au 1/200 (Invitrogen) : pénicilline (10000 UI), streptomycine (10000 µg) et Amphotéricine B (25µg/ml) et 1% de L-glutamine (Cambrex), 5% Sérum veau fœtal (eurobio). Le milieu est changé toutes les 48 heures et lorsque les cellules arrivent à 80-90% de confluence dans les boîtes T75 cm^2, elles sont lavées par 5 ml de PBS sans $CaCl_2$ ni $MgCl_2$ (Invitrogen), décollées grâce à une incubation à 37°C avec 2 ml de trypsine 0.5g/L activée avec du tetraacétate d'éthylène diamide (EDTA) à 0.2g/L. La réaction est arrêtée par l'ajout de DMEM:F12 /5% SVF qsp 10ml. Après comptage des cellules réalisé sur une cellule de Malassez ou dans un compteur Beckman-Coulter ZM (Coulter Electronics, Luton, Angleterre), elles sont réparties dans des plaques 6 puits à raison de 3.10^5 cellules par puits.

2.2. Transfection des cellules COS1

Elle est résumée sur la figure 20.

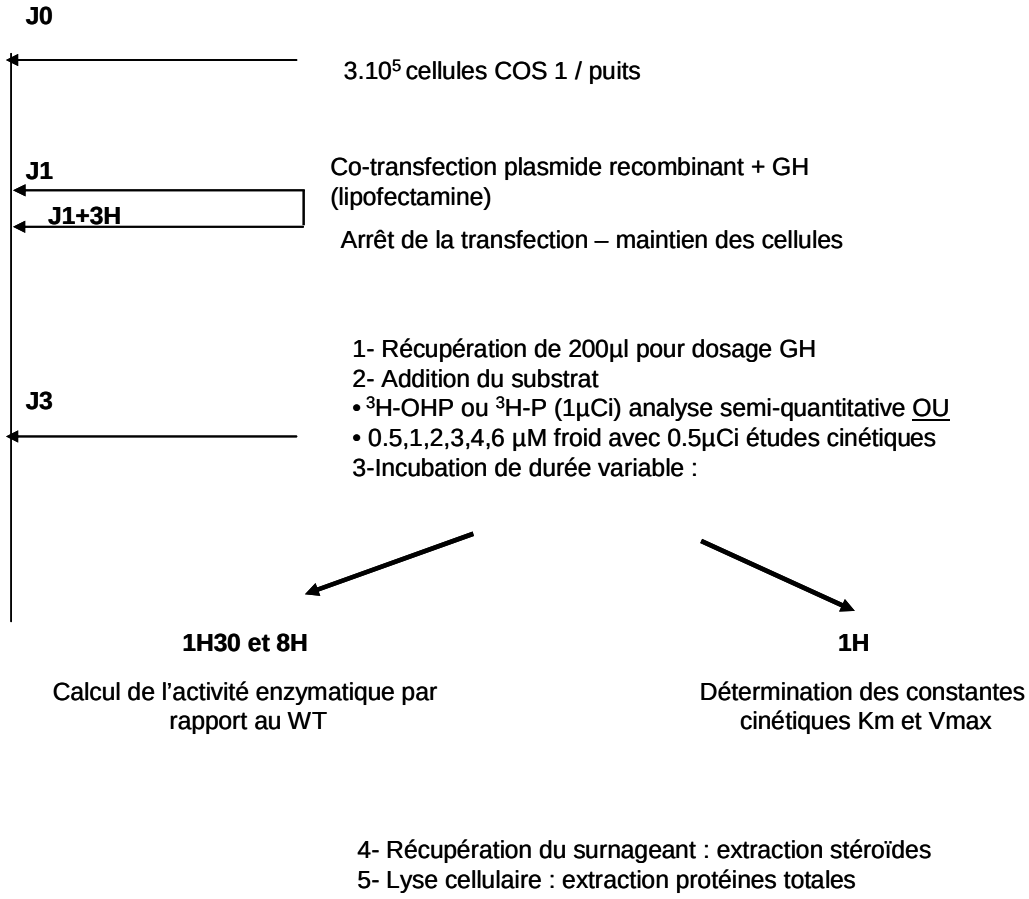


FIGURE 20 : Etude fonctionnelle dans les cellules COS-1

2.2.1. Principe

La transfection est réalisée grâce à la lipofectamine (Invitrogen) qui est un système contenant un mélange de deux types de liposomes (3/1): le lipide cationique DOSPA (2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido) ethyl]-N, N'-dimethyl-propaniumtrifluoroacetate et le lipide neutre DOPE (dioleolyl phosphatidylethanolamine). Les lipides chargés positivement forment un complexe avec les acides nucléiques pré-complexés avec le plus Reagent®, réactif fourni avec le kit pour améliorer l'efficacité de la transfection. Une fois formé, ce complexe va être transféré aux cellules en culture par fusion avec la membrane plasmique. Une co-transfection est réalisée avec le plasmide GH afin de vérifier l'efficacité de la transfection est la même dans tous les puits.

2.2.2. Protocole

Le jour de la transfection (figure 20), les cellules doivent être environ à 50-60% de confluence dans les plaques 6 puits. Après aspiration du milieu de culture, les cellules sont

rincées deux fois par 1 mL de PBS sans $CaCl_2$ ni $MgCl_2$, puis par 1mL de milieu DMEM/F12 sans complément, les antibiotiques et le sérum de veau fœtal pouvant interférer avec la transfection. Ensuite ce milieu est remplacé par 800 µl de DMEM/F12 et les cellules incubées dans l'étuve pendant la préparation du complexe ADN-liposomes.

Pendant ce temps un premier prémix est préparé, composé de la façon suivante et ce pour un puits :

- qsp 100 µL DMEM/F12 sans complément
- 1µg de plasmide étudié
- 1µg du plasmide GH
- 6µL de Plus Reagent®

Après agitation manuelle douce ce mélange est incubé 15 minutes à température ambiante. Pendant cette incubation, un deuxième prémix est préparé, contenant pour chaque puits :

- 100 µL de milieu DMEM/F12
- 4µL de lipofectamine

Après les 15 minutes d'incubation, 104 µL du prémix 2 sont ajoutés au prémix 1 et le mélange est de nouveau incubé 15 minutes à température ambiante

Enfin, 200 µl du mélange ajoutés goutte à goutte dans chaque puits, en remuant légèrement la plaque.

La transfection est arrêté par ajout de 2 ml de milieu DMEM/F12 5% SVF après 3 heures d'incubation à 37°C.

Enfin, la lipofectamine étant à la longue toxique pour les cellules, le milieu de culture est changé 24h après la transfection.

2.3. Détermination de l'activité enzymatique

2.3.1. Principe

Quarante huit heures après la transfection, la protéine d'intérêt est exprimée en quantité suffisante dans les cellules pour pouvoir synthétiser les produits à partir des substrats ajoutés. Les cellules sont alors incubées avec du milieu de culture contenant les précurseurs de l'enzyme CYP21, marqués au tritium : Progestérone [1,2,6,7,-^{3}H(N)] (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA, activité spécifique 102.1 Ci/mmol) et 17α-Hydroxy[1,2,6,7-^{3}H]progestérone (Amersham Biosciences, Royaume-Uni, activité spécifique 75 Ci/mmol). Les produits radioactifs obtenus seront respectivement la désoxycorticostérone et le 11-désoxycortisol.

Cette incubation est réalisée sur des cellules transfectées par

- Le plasmide pCMV4 vide pour vérifier l'absence d'activité stéroïdogénique des cellules COS1.

- Le plasmide pCMV4 contenant l'ADNc CYP21 sauvage (WT)

- Un plasmide pCMV4 contenant l'ADNc CYP21 avec une mutation servant comme contrôle d'activité modérée ou sévère

- Le plasmide pCMV4 contenant l'ADNc CYP21 à tester

Une chromatographie sur couche mince est réalisée pour séparer le substrat et le produit. L'analyse est faite après autoradiographie de cette chromatographie. Le degré de conversion du substrat est exprimé par rapport au WT.

2.3.2. Protocole

Après 48h d'incubation à 37°C, le milieu est remplacé par 2 ml du milieu DMEM/F12 contenant 1µCi de Progestérone-^{3}H ou 17-OH-Progestérone-^{3}H donc une quantité de 0,01µM ce qui correspond à 600 000 cpm (figure 20).

Après 1h30 d'incubation du substrat tritié (temps d'incubation nécessaire pour la fomation d'une quantité suffisante de produits sans consommation du substrat en entier, ce qui nous permet de quantifier les deux) et 8 heures d'incubation (deuxième temps d'incubation choisi comme un deuxième contrôle de l'évolution de la réaction enzymatique), 1 ml de milieu de culture est récupéré pour extraction des stéroïdes. 500 µl du surnageant sont extraits par 5 ml du mélange acétate d'éthyle/isooctane 1/1.

Après homogénéisation par agitation manuelle pendant 1 minute, deux phases sont obtenues : la phase supérieure organique qui contient les stéroïdes et la phase inférieure aqueuse qui contient le milieu de culture.

Le tube est placé dans l'azote liquide pour congeler la phase aqueuse et pouvoir ainsi transférer la phase organique dans un nouveau tube. Les stéroïdes sont concentrés par séchage de la phase organique sous air. Une deuxième extraction de la phase aqueuse est réalisée comme précédemment. Une fois que la phase organique est séchée, les tubes sont rincés par 500 µl d'éthanol absolu, qui sera ensuite évaporé sous air. Le culot est repris dans 25 µl d'éthanol contenant des stéroïdes froids (17-OHP+S/Progestérone+DOC) à la concentration de 6,25µg/µl et déposé sur une plaque de gel de silice sur verre 20x20 cm. La migration a lieu par capillarité dans une chambre où se trouve le mélange chloroforme/acétate d'éthyle : 80/20. Lorsque le solvant arrive à 1-2 cm du haut de la plaque, celle-ci est retirée de la chambre, mise à sécher à l'air libre et les stéroïdes froids sont révélés par éclairage sous UV. Les stéroïdes radioactifs sont révélés soit par autoradiographie classique soit à l'aide du phosohorImager (FLA 7000,

Fujifilm). La technique par autoradiogarphie classique consiste à placer la plaque dans une cassette pour autoradiographie et à exposer une nuit à -70°C. La plaque est préalablement vaporisée avec une solution permettant d'amplifier le signal du tritium : « En^{3}Hance spray» (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, USA). Les autoradiographies sont scannées et la quantité de pixel de chaque spot est déterminée grâce au logiciel « Scion Image ». En cas de révélation à l'aide du phosporImager, la plaque est placée dans une cassette avec des écrans à usage multiple spécial tritium, et exposée une nuit à température ambiante. Les écrans sont scannées dans le FLA 7000 et la quantité de Pixel de chaque spot est calculée grâce au logiciel Multigauge (Fujifilm). Une fois la quantité de pixel obtenue, l'activité de l'enzyme 21-hydroxylase pour chaque substrat est déterminée en calculant le pourcentage de conversion du substrat en produit par rapport au plasmide sauvage ; ce calcul nécessite une correction avec le contenu en protéines totales.

2.4. Détermination des constantes cinétiques

2.4.1. Principe

La cinétique de Michaelis-Menten décrit les variations de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration du substrat. Le modèle considère une quantité fixe d'enzyme. On fait varier la concentration du substrat et on observe une augmentation de la vitesse initiale de la réaction. Au début lorsque les concentrations sont faibles, la quantité d'enzyme est en excès et toutes les molécules du substrat sont transformées. La vitesse est proportionnelle à la concentration en substrat.

Lorsque la concentration du substrat monte encore, le nombre des molécules de substrat est si grand que toutes les molécules d'enzymes sont occupées et la vitesse de réaction ne peut donc augmenter. La courbe de la vitesse de la réaction atteint très progressivement la valeur maximale, car en réalité c'est une hyperbole. La vitesse maximale est donnée par l'asymptote de cette hyperbole (Vmax). Pour une vitesse égale à la moitié de la vitesse maximale, la concentration en substrat pouvait être précisée de façon plus exacte ceci correspond à KM, paramètre spécifique de l'enzyme.

Pour préciser la valeur de Vmax, Lineweaver et Burk ont développé une méthode graphique en inversant les deux termes de la relation de Michaelis-Menten : $y = ax+b$ où a est égal à Km/Vmax et b=1/Vmax. La variation de 1/V en fonction de 1/S est représentée par une droite dont la pente est a. Quant à b, il représente le point de l'intersection avec l'axe Y.

La pente est égale à Km/Vmax et l'intersection avec l'axe des Y est 1/Vmax.

2.4.2. Protocole

Des études cinétiques sont réalisées pour chaque mutation afin de déterminer la conséquence de la mutation sur l'affinité avec le substrat ou la vitesse maximale de transformation; ainsi, les cellules COS-1 intactes sont incubées pendant 1 h selon le même protocole que précédemment en rajoutant des quantités croissantes de stéroïdes froids 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 et 6.0 µmol/l. avec 0.5µCi de substrat marqué au tritium. Les constantes cinétiques sont calculées à partir des vitesses de réaction du CYP21 pour chacune des concentrations du substrat froid. Les calculs sont réalisés grâce au logiciel Graph Pad Prism version 5.0.

2.5. Quantification des protéines totales

2.5.1. Principe

La concentration des protéines est mesurée à l'aide de la méthode de Bradford (Bradford 1976). Cette méthode de dosage est basée sur la propriété des protéines de réduire les ions Cu^{2+} en Cu^{+} en milieu alcalin (réaction de Biuret) qui en se complexant avec l'acide bicinchoninique donne une coloration bleue intense. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des ions Cu^{+} formés et donc à la concentration des protéines.

2.5.2. Protocole

Les cellules sont collectées dans du tampon de Lyse [150 mM NaCl ,10mM Tris HCl (pH 7,4), 1mM EDTA , 1mM EGTA ,1% Triton X-100 ,0.5 % NP40 , H2O qsp 100 ml, inhibiteurs de protéases (Sigma-aldrich)] après lavage avec du PBS. La lyse cellulaire est assurée par 3 cycles de congélation - décongélation dans l'azote liquide. Les protéines totales sont séparées des débris cellulaires par ultra-centrifugation (13000 rpm à 4°C pendant 30 minutes).

Les échantillons à tester sont dilués au cinquième dans le tampon de Lyse utilisé précédemment de façon à avoir une concentration compatible avec celle de la gamme étalon de BSA.

Le dosage est réalisé sur des doubles de 10 µl de chaque dilution (standards et échantillons), placés dans les puits d'une plaque multipuits (96 puits), en présence de 200 µl de réactif. La plaque est incubée pendant 30 min à 37°C, puis la lecture de l'absorbance à 562 nm est réalisée dans un lecteur de plaques à l'aide d'un programme approprié.

2.6. Dosage de la hGH

2.6.1. Principe

L'hormone de croissance humaine est une hormone polypeptidique de 22 KD, formée de 191 acides aminés liés par deux ponts disulfures.

Le hGH-RIACT est un essai immunoradiométrique. Deux anticorps monoclonaux sont préparés contre les sites antigéniques de la molécule hGH. Le premier anticorps vient se coller sur la paroi du tube, le deuxième marqué avec de l'iode 125, est utilisé comme un traceur.

Les molécules de l'hGH à doser vont venir s'intercaler entre les deux anticorps. Une fois le sandwich anticorps/antigène/anticorps iodé formé, le traceur non lié est facilement éliminé par une étape de lavage.

La radioactivité liée au tube est proportionnelle à la concentration d'hGH présente dans l'échantillon.

2.6.2. Protocole

L'essai demande d'avoir plusieurs groupes de tubes (tableau 10) :

- Groupe 0 étalon pour la détermination de liaison non-spécifique
- Groupe étalon pour établir la courbe étalon
- Groupe contrôle pour les contrôles
- Groupe Sx pour les échantillons à tester

TABLEAU 10 : Protocole de dosage de la GH

Tubes	**Etalons (µL)**	**Echantillons (µL)**	**^{125}I anti-hGH (µL)**		
Etalons	50	-	300	Incuber 2 heures ± sous agitation à 18-25°C.	Aspirer le contenu des tubes + 3 ml de solution de lavage 5 minutes attente Aspirer + 3ml de solution de lavage 5 minutes attente Aspirer
Contrôle	-	50	300		
Echantillons	-	50	300		

Ainsi une courbe étalon est établie (en cpm) et les concentrations des échantillons sont déduites de cette courbe.

2.7. Analyse de l'expression protéique par Western Blot

2.7.1. Principe

Le Western Blot est un contrôle indispensable pour montrer que la mutation n'affecte pas la fonction de la protéine, mais seulement l'activité enzymatique. De plus, il permet de vérifier qu'il n'ya pas de modification de taille. Une quantité similaire de protéines normales et mutantes sont analysés par Western blot. Cette méthode sépare les protéines par électrophorèse en gel de

polyacrylamide en condition dénaturante suivie d'un électro-transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose ou PVDF. Les protéines d'intérêt sont ensuite révélées par des anticorps spécifiques. Un anticorps polyclonal de lapin est utilisé, dirigé contre le cytochrome CYP21 humain (fourni par le Dr W.L. Miller) suivant un protocole standard (Invitrogen). Il permet ainsi de valider les résultats enzymatiques en montrant que la même quantité de protéines CYP21 est présente.

2.7.2. Protocole

- Les protéines totales dosées sont tout d'abord dénaturées et migrées sur un gel d'électrophorèse en polyacrylamide avec du sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE).

- Les protéines séparées suivant leur taille sont ensuite transférées sur une membrane en PVDF (PolyVinylidine DiFluoride, Invitrogen) placée face-à-face avec le gel ; sous courant électrique les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Il résulte de ce « blotting » que les protéines sont exposées sur une surface mince, ce qui facilite les étapes de détection ultérieures. Les membranes de PVDF doivent être imbibées de méthanol à 100% avant leur utilisation (figure 21).

- Une fois transférées, les sites d'interactions non spécifiques sont bloqués par lavage de la membrane avec du lait dilué à 5% [5g de lait dans 100 ml de PBS-tween à 0.1% (PBS 1X 100 ml, TWEEN 20 1ml, H2O qsp 1L)] pendant une heure à température ambiante. Les protéines du lait vont ainsi se lier dans tous les sites non occupés par les protéines migrées ceci nous permettra d'avoir un résultat plus clair dans le produit final du Western Blot.

- Après le blocage, une solution d'anticorps primaire dilué au 1 /40 000ème dans du tampon PBS-tween 0.1%+1% lait est incubée avec la membrane pendant 1 heure sous agitation modérée à température ambiante ou une nuit à + 4°C.

- La membrane est rincée 3 fois 10 min sous agitation dans du PBS-tween 0.1% +1% lait afin d'enlever les anticorps primaires non liés, elle est ensuite exposée à l'anticorps secondaire (anti IgG de lapin marqué à la peroxidase de raifort, en conjonction avec un agent luminescent) dilué au 1/5000, 1 heure à température ambiante.

- Les membranes sont lavées rapidement 3 fois puis 2x10 min sous agitation dans du PBS-tween 0.1% + 1% lait et enfin par > 30 ml de PBS pur 10min.

- Une analyse par chimioluminescence est à la fin réalisée pour détecter visuellement les protéines normales et mutantes. La peroxydase marquant l'anticorps secondaire oxyde le luminol en présence de peroxyde d'hydrogène fournis à l'aide du kit ECL plus (Enhanced

Chemiluminescence plus, Amersham). Le luminol excité revient à son état initial en émettant une lumière à 428 nm détectée par un film photographique (Biomax MR, Kodak).

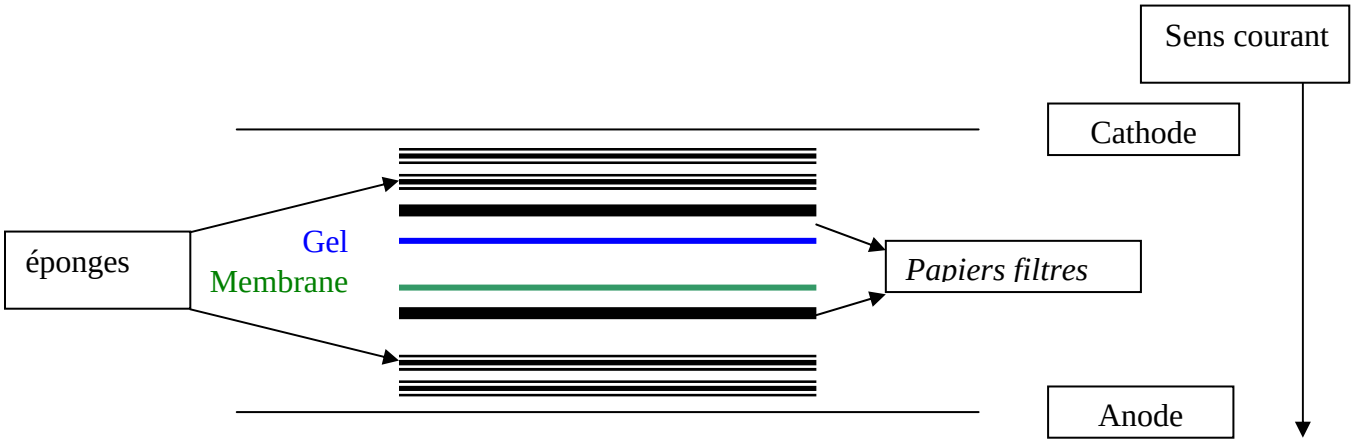


FIGURE 21 : Electrotransfert par Western blot

III. Etudes structurales des cytochromes CYP21, POR et CYP11B1

Les études structurales *in silico* permettent d'évaluer le retentissement des mutations sur la structure de la protéine, donc sur la fonction enzymatique ; il est intéressant d'en confronter les résultats avec ceux des études fonctionnelles afin d'évaluer la sévérité des mutations rares.

La modélisation par homologie est une technique prédictive basée sur l'élaboration d'une structure tridemsionnelle dont la séquence en acides aminés est connue. Le modèle 3D renfermant la mutation à analyser est comparé avec celui construit à partir de la séquence normale. Plusieurs paramètres sont étudiés :

- La stabilité de la protéine mutée
- le changement de classe d'acide aminé
- la taille et l'orientation de la chaîne latérale du nouvel acide aminé
- la distance entre l'acide aminé et la surface de la protéine (acide aminé enfoui / exposé)
- les distances à l'hème et au substrat
- la capacité de liaison aux différents partenaires d'oxydoréduction.

Nous avons utilisé la modélisation par homologie pour construire les modèles CYP21, POR et CYP11B1. Ce travail a pu être réalisé grâce à une formation dont nous avons bénéficié à la Chaire de Bioinformatique du CNAM et intitulée « Banques de données bioinformatiques et prédiction des fonctions biologiques » ainsi que les conseils du Dr Jacques CHOMILIER de l'Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés (Paris).

1. Construction du modèle par homologie

La technique de modélisation par homologie est basée sur d'une part la séquence en acides aminés de la protéine à analyser et d'autre part sur les structures 3D connues de protéines avec une séquence en AA similaire.

Le processus de cette technique avec les différentes étapes est illustré dans la figure 22 :

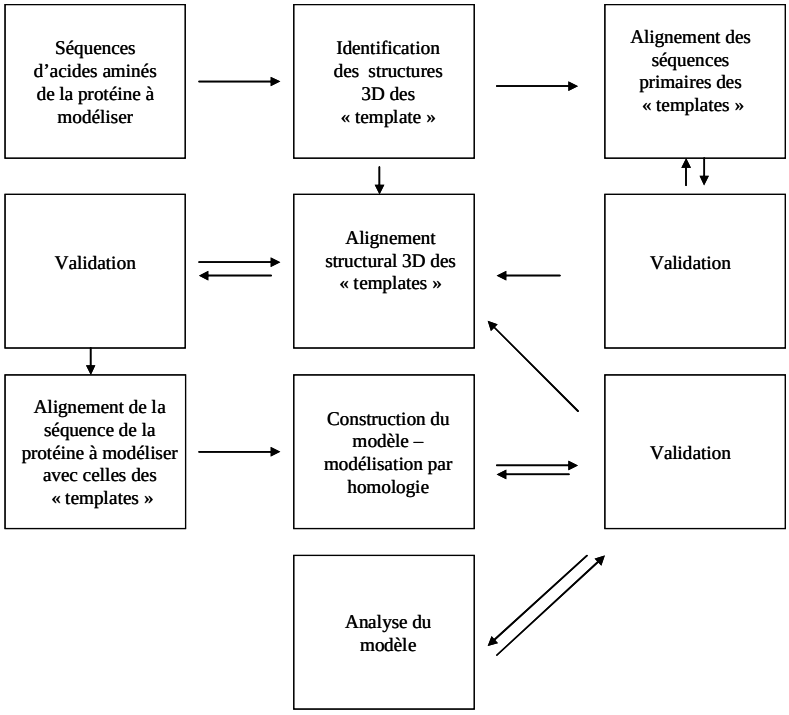


FIGURE 22 : Procédure de modélisation par homologie d'après Kirton et al. 2002 *(Kirton et al., 2002)*

1.1. Identification des « templates » avec une structure 3D connue

Il a été démontré que les protéines avec des séquences d'acides aminés similaires ont une tendance à adopter une structure 3D comparable, d'où l'utilisation de modèles ou « templates » ayant le plus fort score d'homologie de séquences avec la protéine à modéliser. Ces structures peuvent être recherchées dans la « protein data bank » (PDB) (Berman et al., 2000), site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) en réalisant un BLAST avec un algorithme comme le PSI-BLAST (Altschul et al., 1997), site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Le score PSI-BLAST est calculé en additionnant les scores de chaque position alignée et les scores des trous.

Il faut tenir compte du pourcentage d'identité de séquences. Il est très difficile de construire un modèle en utilisant des «templates» avec un pourcentage d'identité de séquences inférieure à 25%.

1.2. Alignement structural des « templates »

Les études ont montré que le site actif des cytochromes procaryotes est conservé au sein de la famille des cytochromes P450 mammifères malgré la faible homologie de séquences.

La variabilité entre les différents cytochromes concerne d'autres régions : la partie N-terminale liée à la membrane, l'hélice B' présente ou non et la boucle F-G dont la modélisation est plus délicate (Modi et al., 1996), (Hasemann et al., 1994), (Ridderstrom et al., 2000), (Hasemann et al., 1995). Il faut trouver des séquences avec une forte homologie et si ce n'est pas possible, différents «templates» seront utilisés pour obtenir le maximum d'informations sur les parties variables.

Nous avons utilisé le serveur Clustal W pour aligner les différentes séquences protéiques (http ://www.ebi.ac.uk/clustalw/). Les positions des acides aminés conservés sont des indicateurs de leur importance structurale ou fonctionnelle.

1.3. Edition des résultats avec le logiciel GENEDOC

Ce logiciel permet d'éditer les alignements multiples réalisés à l'aide de « Clustal W », afin de les affiner en fonction des données fonctionnelles et structurales.

1.4. Prédiction des structures secondaires

La prédiction des structures est réalisée grâce au serveur « JPRED» ou « PSIPRED». Elle permet de prédire la structure secondaire de notre protéine.

1.5. Construction du modèle 3D

Le modèle généré par la technique de modélisation par homologie va dépendre du choix des templates et de l'alignement de séquence utilisé. Les programmes de modélisation par homologie utilisent deux approches, en une seule étape (« single-step approach ») ou basée sur le fragment (« fragment-based approach »). Les deux aboutissent à un résultat équivalent.

1.5.1. Approche basée sur une seule étape

Cette méthode se base sur les caractéristiques structurales du modèle, comme la chaîne carbonée principale et la position des liaisons hydrogènes, avec une probabilité de distribution des AA basée sur la structure du « template » et sur la stéréochimie de chacun des AA.

Ainsi, plusieurs modèles sont construits avec une distribution et une conformation différentes. Si des problèmes stériques surviennent, ils peuvent être dus à une erreur d'alignement des séquences primaires, d'où la nécessité absolue de valider l'alignement avant la construction du modèle en le comparant avec l'alignement 3D du template, ceci grâce aux

graphiques moléculaires interactifs (Insight II et Quanta, Accelrys Inc. http ://www.accelrys.com). L'avantage majeur de cette approche est l'introduction des distances de contraintes entre les acides aminés en tenant compte de ce qui est observé expérimentalement et des différents modèles générés. (Exemple de programme : MODELLER site http://guitar.rockefeller.edu /modeller/modeller.html (Sali and Blundell, 1993).

1.5.2. Approche basée sur le fragment

Elle consiste à diviser la protéine en trois parties : les régions bien définies de la chaîne carbonée du polypeptide (régions structuralement conservées), les régions peu définies (structuralement variables) et les chaînes latérales des acides aminés.

Plusieurs étapes sont nécessaires : construction de la chaîne carbonée des régions structuralement conservées (exemple du domaine de liaison à l'hème), liaison de ces régions à celles qui sont structuralement variables grâce à l'utilisation du template. Ensuite, si nécessaire, les atomes situés au niveau des chaînes latérales des acides aminés sont modifiés. Enfin, la minimisation d'énergie du modèle est réalisée, dernière étape de sa construction.

Plusieurs programmes sont disponibles pour la construction d'un modèle en ayant recours à l'approche basée sur le fragment ; nous avons retenu pour la construction des différents modèles au laboratoire, SWISSMODEL (site http ://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html) et utilisé le logiciel graphique moléculaire gratuitement téléchargeable « DEEP VIEW » (appelé initialement Swiss-PDB viewer) (Kaplan and Littlejohn, 2001). La version utilisée version 4.0 est disponible pour Macintosh, Windows, Linux, et SGI's Irix. Elle a été configurée pour pouvoir travailler en association avec le serveur ExPAsy (Expert Protein Analysis System) et réaliser le criblage des banques telles que « SWISS-PROT » ou « ExPDB », à l'aide de l'alogorithme PSI-BLAST et en conjonction avec SWISSMODEL.

Le modèle a été construit en suivant les étapes telles qu'elles sont décrites dans le tutoriale du logiciel :

1. Cliquer sur « Load Raw Sequence to Model » du menu « SwissModel » pour pouvoir télécharger la séquence FASTA de la protéine à modéliser ; cette dernière apparaît en tant que longue chaîne d'hélice alpha ;
2. Du menu « Preferences », choisir l'item « SwissModel » et entrer le nom, l'adresse e- mail, et sélectionner le navigateur web favori ;
3. Choisir « Find Appropriate ExPDB templates » du menu « Swissmodel ». Une fenêtre avec la séquence primaire de la protéine à modéliser apparaît ;
4. Cliquer sur « Submit », une liste de code pdb des « templates » téléchargeables est proposée ;

5. Choisir le « template » approprié en tenant compte du score du blast et de la méthode utilisée pour l'élucidation de la structure 3D du « template », en sachant qu'il est recommandé de choisir les structures déterminées par diffractométrie de rayons X et ayant une résolution « R » la plus petite possible, puis télécharger la structure 3D sous format .pdb ;
6. Cliquer à partir du menu « file » sur « open PDB » et choisir le fichier téléchargé ;
7. Recentrer les deux protéines en cliquant sur « = » après avoir cliqué sur l'item « visible » de la fenêtre du panneau de configaration « Control panel » ;
8. Sélectionner le « show sequence alignment » dans le menu « window »
9. Sélectionner « Iterative magic fit » pour aligner la protéine sur le « template »
10. Valider l'alignement par la méthode manuelle « HCA » et si besoin corriger dans la fenêtre « Align » ;
11. Une fois l'alignement validé, choisir « Select aa making clashes » à partir du menu « Select », puis « Fix selected sidechains » à partir du menu « tools » et ceci plusieurs fois. Ceci permettra d'avoir une information sur la qualité du modèle ;
12. Enfin, sélectionner dans le menu « Swiss model » « Submit modelling request » ; Par défaut, un fichier avec le projet travaillé va être créé et tandis qu'en parallèle un projet sera envoyé par mail.

1.6. Validation du modèle 3D

Cette étape est indispensable et elle est basée sur plusieurs paramètres :

1.6.1. Validation de l'architecture des cytochromes P450s

L'architecture du modèle est comparée à celle des autres cytochromes, notamment en vérifiant la présence des 12 hélices α (A à L), 6 feuillets β, et des petites hélices (B', G', J', K'). Nous avons également vérifié la présence des motifs caractéristiques de cette famille de protéines :

1. Motif W(R/K)XXR (X correspondant à n'importe quel acide aminé) au sein de l'hélice C qui est nécessaire pour la liaison et la stabilité de l'hème dans le site actif ;
2. Motif EXXR au sein de l'hélice K ;
3. Motif (W/F)XXPXX(F/Y)XPX(H/R)(W/F) situé après l'hélice K' et qui comprend la région « meander » ;
4. Motif XXF(G/S)XGX(H/R)XCXGXX(L/F)AXXE situé avant l'hélice L contenant le résidu cystéine impliqué dans la liaison à l'hème ;

5. L'acide glutamique très conservé entre les différentes structures et probablement impliqué dans la formation du canal d'eau qui est important pour la réaction catalytique (Poulos and Raag, 1992) : cet acide glutamique correspond au Glu366 dans le CYP101, Glu459 dans les CYP11B1 et B2 et Glu437 dans le CYP21 ;
6. La thréonine catalytique qui est très conservée et situées au milieu de l'hélice I : cette thréonine correspond à la Thr252 dans le CYP101, Thr318 dans les CYP11B1 et B2, Thr295 dans le CYP21 (Poulos and Raag, 1992).

1.6.2. Attribution des structures secondaires

Le serveur MATRAS http ://biunit.aist-nara.ac.jp/matras/ nous a permis d'aligner nos modèles avec le « template » afin de vérifier la bonne homologie de séquences.

1.6.3. Superposition des structures tertiaires

Il a été montré que le calcul d'écart quadratique moyen ou déviation structurale (en anglais « RMSD » pour Root Mean Square Deviation), entre la structure modélisée et la structure cristallographique de départ, est une bonne méthode d'évaluation et de comparaison entre protéines modélisée et cristallisée.

La superposition du modèle et du « template » a été réalisée grâce au serveur http ://wishart.biology.ualberta.ca/SuperPose/, ce qui a permis d'obtenir le rapport RMSD. Il est recommandé que ce rapport soit inférieur à 2, avec une tolérance jusqu'à 4.

1.6.4. Elaboration du diagramme de Ramachandran

Nous avons obtenu le diagramme de Ramachandran grâce au serveur RAPPER http ://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php qui permet de vérifier la cohérence de la structure élaborée. On peut également se servir de la version fournie par swiss pdb viewer (menu « Window », fonction « ramachandran plot »).

La compréhension de ce diagramme nécessite le rappel de quelques notions de base sur la structure des protéines :

1- Structure primaire :

C'est la séquence linéaire des acides aminés (ou résidus) liés entre eux par une liaison peptidique. Les ponts disulfures sont inclus dans cette structure.

2- Structure secondaire :

a- Le squelette

Chaque acide aminé est constitué d'un squelette (N, Cα, C et O) également appelé chaîne principale, et d'une chaîne latérale. Deux angles dièdres phi ϕ (entre le N et Cα) et psi ψ (entre Cα et le C) sont à l'origine des différentes conformations que peut prendre un polypeptide. La liaison peptidique qui relie deux acides aminés successifs est caractérisée par un angle dièdre ω (entre le C du résidu n et le N du résidu n+1) constant (180° dans la quasi-totalité des cas ce qui correspond à une conformation trans) (figure 23).

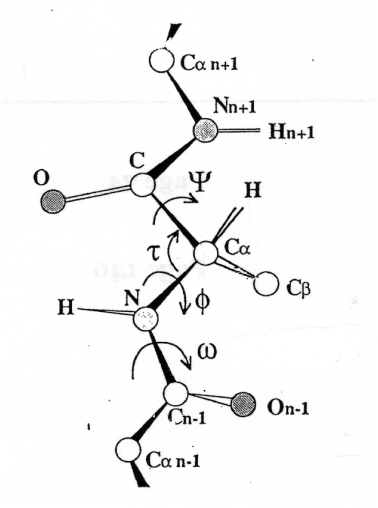


FIGURE 23 : Liaison peptidique et les différents angles dièdres

b- Les conformations

Les stéréoisomères sont des molécules de même composition atomique mais d'arrangement spatial différent.

Deux molécules dont la disposition des atomes dans l'espace est indépendante des rotations autour des liaisons simples sont des énantiomères. Il y a deux **configurations** R et S suivant si la rotation se fait dans le sens des aiguilles d'une montre ou pas.

Deux molécules dont les arrangements des atomes ne se différencient que par des rotations autour des liaisons simples sont des diastéreoisomères. Ce sont des **conformations** L et D. Cette nomenclature suit la Loi de CORN (acronyme de COOH, R et NH2). Si on forme CORN dans le sens des aiguilles d'une montre c'est L sinon c'est D. Les acides aminés naturels sont de conformation L (sauf la glycine).

c- Diagramme de Ramachandran (figure 24)

Trois zones sont définies :

- Zone a : hélices droites
- Zone b et p : feuillets
- Zone l et g : hélices gauches

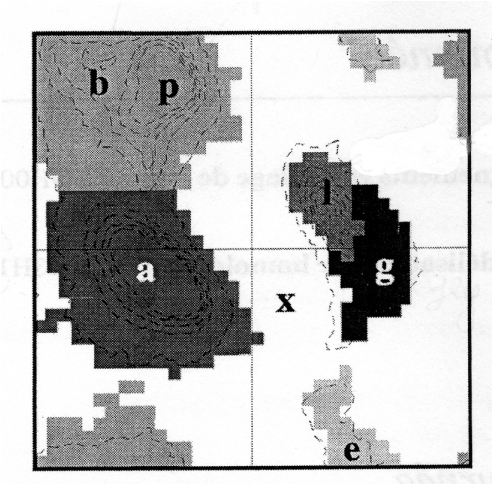


FIGURE 24 : Diagramme de Ramachandran

Même dans les boucles seules ces zones sont permises et celles qui sont interdites sont notées x. Dans la plupart des cas les angles dièdres phi sont négatifs sauf la glycine et l'asparagine (zone l et g). La proline occupe souvent la portion p et la zone bêta du diagramme de ramachandran.

A noter que PGDSN sont majoritairement dans les boucles, LM dans les hélices et IV dans les brins. H est indifférent.

1.6.5 Calculs des énergies par la méthode Anolea

La méthode Anoléa (Melo F et L 97 et 98) réalise les calculs d'énergie au sein d'une chaîne protéique, évaluant ainsi l'environnement à distance pour chaque atome. Ce calcul provient d'une base de données de 147 chaînes protéiques avec une identité de séquences inférieure à 25 % et analysées par diffractométrie de rayons X (résolution inférieure à 3Å).

1.6.6 Minimisation d'énergie par le logiciel Gromos

Ce programme, inclus dans « DEEP VIEW », permet d'effectuer une minimisation d'énergie en réparant, par déplacement des atomes, les géométries déformées; ceci conduit à supprimer les contraintes internes, comme le montre la figure 25 :

Avant minimisation Après minimisation

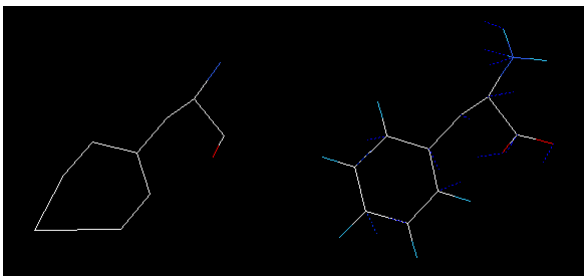


FIGURE 25 : Géométrie d'une molécule avant et après minimisation d'énergie

On peut ainsi pour chaque acide aminé calculer le champ de force et valider l'énergie qui lui est liée.

1.6.7. Analyse de la compatibilité structure 3D – structure primaire Verify 3D

Elle est basée sur l'utilisation du serveur Verify 3D ; chaque résidu est attribué à une classe structurale selon son emplacement (hélice, boucle, feuillet), son environnement (polaire, non polaire). Une banque de structures de référence est consultée afin d'obtenir un score pour chacun des 20 acides aminés. Les scores varient entre -10 et +10 (bowie et al. 91, Luethy et al.,92), l'idéal étant d'obtenir le maximum de scores positifs.

2. Exploitation du modèle

2.1. Identification des résidus impliqués dans les différents domaines

2.1.1. Liaison au substrat

Pour identifier les résidus impliqués dans la liaison au substrat, la progestérone a été ajoutée dans le modèle, après sa superposition au cytochrome mammifère CYP51 (avec un stéroïde estriol lié, code PDB 1X8V) (Podust et al.,2004).

Les deux stéroïdes, estriol et progestérone, ont une structure et une taille proches et les deux protéines CYP21 et CYP51 sont homologues (22 % d'identité de séquences).

La superposition des deux protéines est faite en prenant l'hème comme repère, les étapes étant les suivantes :

❖ Sélection de l'hème de chacune des deux protéines dans la fenêtre du « Control Panel » ;

❖ Sélection « Fit Molecules from selection » a été sélectionné du menu « Fit » ;

❖ Après superposition des deux protéines, la molécule d'estriol est transférée au modèle CYP21 puis remplacée par la progestérone après superposition des deux stéroïdes ;

❖ Les acides aminés inclus dans une sphère de 5Å sont considérés comme inclus dans le domaine de liaison au substrat.

2.1.2. Liaison à l'hème

Après avoir sélectionné l'hème de la fenêtre du « Control Panel », l'item « Neighbours of selected residues » (<5Å) est sélectionné du menu « Select ». Les acides aminés inclus dans la sphère de 5 Å sont considérés comme inclus dans le domaine de liaison à l'hème.

2.1.3. Interaction avec le partenaire d'oxydo-réduction

La région de liaison au partenaire d'oxydo-reduction a bien été étudiée pour le cytochrome mammifère CYP2B4 qui a une identité de séquences de 28 % avec CYP21 (Bernhardt et al., 1984), (Bernhardt et al., 1988), (Shen and Strobel, 1993), (Bridges et al., 1998), (Lehnerer et al., 2000). Après superposition de la structure de CYP21 à celle de CYP2B4, les résidus importants pour la liaison au partenaire d'oxydo-réduction ont été déduits au niveau de CYP21.

2.1.4. Accessibilité au solvant

L'accessibilité au solvant permet de détecter un changement de classe d'acides aminés avec possibilité selon les cas de perturbations dans les interactions électrostatiques. La détermination de l'accessibilité au solvant peut être réalisée de deux façons :

- En cliquant sur la touche « Accessible Residues » du Menu « Select » avec obtention du seuil d'enfouissement qui doit être compris entre 20 et 30% ;
- En utilisant le site de Ressource Parisienne en Bioinformatique Structurale (http ://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/html/fr/T0_Home.html).

2.2. Paramètres analysés pour la prédiction des mutations

Le critère essentiel dans la détermination de la conséquence d'une nouvelle mutation est sa localisation dans la structure 3D, par rapport aux domaines décrits ci-dessus. Dans le logiciel « DEEP VIEW » les structures secondaires apparaissent automatiquement dans le « control panel ». Après la mutation d'un résidu, il faut regarder s'il y a eu changement de la structure secondaire. La stabilité de la protéine est évaluée par le calcul d'énergie ; plus le champ de force de l'acide aminé est grand, moins la protéine est stable.

Puis, une analyse fine du changement d'acide aminé est réalisée, la conséquence étant variable selon le domaine protéique touché.

Ceci sera détaillé dans la partie « Résultats Discussion », chapitre IV-3.

3. Etude de l'interaction ou « Docking » entre CYP21 et POR

Nous avons construit à l'aide du logiciel « DEEP VIEW » le modèle de POR humain à partir du modèle de POR du rat déjà cristallisé (code pdb 1AMO) ; puis, après superposition des deux modèles, nous avons introduit les partenaires d'oxydo-réduction (NADP(H), FAD et FMN). Dans une second temps, nous avons réalisé la modélisation d'un complexe protéine-protéine ou « docking », grâce au serveur « HEX» http ://www.csd.abdn.ac.uk/hex_server/. Après avoir téléchargé les deux protéines, le modèle de POR humain et le modèle 2GEG du CYP21, nous avons utilisé comme résidu de référence pour l'interaction entre les deux, l'acide aminé R426 du 2GEG connu comme impliqué dans la réaction d'oxydo-réduction. Le modèle obtenu est sous format pdb et exploitable avec le logiciel « Deep view ».

4. Autres outils prédictifs utilisés pour l'analyse des mutations : « Alamut » - « SIFT » - « Polyphen »

Depuis mars 2008, nous utilisons au laboratoire le logiciel « Alamut ». Il permet notamment une étude *in silico* rapide de tout changement nucléotidique d'un gène en le nommant selon la nomenclature internationale, en précisant sa localisation et en analysant sa conséquence sur l'expression d'un gène (caractère délétère ou non), par une interrogation des bases de données, POLYPHEN et SIFT.

Des rapports de mutations sont ainsi créés pour chaque type de variation avec les informations suivantes : conséquence théorique de la substitution nucléotidique, basé sur l'écart physico-chimique entre les deux acides aminés et leur conservation au sein de différentes espèces.

La répercussion sur la structure peut être aussi obtenue grâce à la consultation directe des deux serveurs POLYPHEN (http ://genetics.bwh.harvard.edu/pph/) et SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant *:* http ://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html).

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

Le but de ce travail était de faire une synthèse des résultats obtenus chez les patients avec une mutation rare détectée au laboratoire. Dans un premier temps seront présentés les données clinico-biologiques et le génotype, puis seront détaillés les résultats des études *in vitro* réalisées pour certaines mutations faux-sens. Enfin, nous présenterons les études *in silico* développées au laboratoire, en montrant comment elles nous ont permis de mieux comprendre la relation structure–fonction de l'enzyme 21-hydroxylase et comment elles ont contribué à la prédiction de la sévérité des mutations non encore étudiées *in vitro*. Ainsi, nous verrons comment toutes ces études fonctionnelles ont permis d'optimiser la prise en charge des malades, tant sur le plan thérapeutique ainsi que pour le conseil génétique à apporter aux familles.

I. Données cliniques et biologiques des patients avec une mutation rare

Parmi les 3200 patients et les 1150 hétérozygotes étudiés au laboratoire, 277 (6.3 %) portent une mutation rare du gène *CYP21A2*, c'est-à-dire de fréquence inférieure à 1 %. Ces mutations rares sont des mutations faux-sens, non-sens ou responsables d'un décalage du cadre de lecture (mutations frameshift). Les patients ont été classés en fonction des données clinico-biologiques transmises par les cliniciens. Les critères pour évaluer la sévérité du phénotype sont les suivants :

- Cliniques : Virilisation des organes génitaux externes des filles en faveur d'une forme classique, perte de sel clinique pour les deux sexes essentiellement pour les enfants nés avant le dépistage néonatal, épisodes de décompensation. Age des premiers signes : pilosité pubienne, degré d'avance d'âge osseux et d'avance staturale, taille finale reflet de l'hyperandrogénie.

- Biologiques : Dépistage néonatal positif, taux de 17-OHP de base +/- sous ACTH, taux de rénine attestant le déficit en minéralocorticoïdes.

La confrontation de ces résultas a permis de classer les patients en quatre groupes :

- Le groupe 1 comprend 121 patients atteints de forme classique (tableau 12).
- Le groupe 2 comprend 112 patients atteints d'une forme non classique (tableau 13).
- Le groupe 3 comprend 11 patients pour lesquels il était difficile de trancher entre formes classique et non classique (tableau 14) ; nous verrons secondairement comment les données de la littérature et les études fonctionnelles nous ont aidés à les classer.
- Le groupe 4 comprend 34 hétérozygotes (tableau 15).

1. Patients atteints de forme classique

Parmi les 1740 patients atteints de formes classiques, 121 (7.0 %) portent une mutation rare du gène *CYP21A2*. Ils sont présentés dans le tableau 12. Les patients 1-93 portent une nouvelle mutation faux-sens isolée ou associée à une mutation connue sur le même allèle, les patients 94-114 portent une mutation non-sens ou une mutation responsable d'une délétion ou d'une insertion d'un ou deux nucléotides et donc d'un décalage de cadre de lecture ; enfin les patients 115-121 portent une délétion plus étendue avec respect ou non du cadre de lecture.

1.1. Bilan des données cliniques

- Age du diagnostic : le classement des patients selon l'âge du diagnostic montre que 64 sur 121 ont été diagnostiqués le premier mois de vie, cinq ayant été diagnostiqués en prénatal. Parmi ces enfants, 24 ont bénéficié du dépistage néonatal. Pour les autres, 42 ont été diagnostiqués après 1 mois de vie, la majorité tôt dans l'enfance. L'âge du diagnostic n'est pas transmis pour 15.

- Virilisation des organes génitaux externes chez les filles : Le signe d'appel le plus fréquent pour le diagnostic de forme classique de déficit en 21-hydroxylase chez les petites filles est la virilisation des organes génitaux externes. La répartition selon le degré de virilisation est présentée dans le tableau 11.

TABLEAU 11 : Degré de virilisation des filles atteintes de forme classique

Stade de Prader	Nombre total	Fréquence sur 61 filles (%)
0	0	0
1	12	19.7
1-2	1	1.6
2	6	9.8
3	8	13.1
3-4	1	1.6
4	15	24.6
4-5	1	1.6
5	3	4.9
Non communiqué	12	19.7
DPN	2	

b- Perte de sel clinique : Avant la mise en place du dépistage néonatal, une perte de sel spontanée pouvait survenir durant les deux premières semaines de vie, essentiellement chez les garçons non repérés ou chez les filles dont la virilisation n'était pas détectée. Le dépistage néonatal a permis de prévenir la survenue d'une perte de sel clinique néonatale par contre

l'équilibre sous traitement pendant les premières semaines permet d'évaluer l'atteinte de la fonction minéralocorticoïde. D'après les renseignements fournis par les cliniciens, 34 sur 121 patients (garçon ou fille) étudiés, auraient présenté une perte de sel clinique.

Autres symptômes : A côté de ces deux premiers symptômes typiques de la forme classique, d'autres signes cliniques ont été rencontrés, conséquences de la production excessive d'androgènes surrénaliens pendant la petite enfance du fait de l'absence de dépistage néonatal : avance d'âge osseux (18 patients), pilosité pubienne (17 patients). Le point important est l'âge d'apparition des symptômes dans l'enfance plus précoce que dans la forme non classique de déficit en 21-hydroxylase.

1.2. Bilan des données biologiques

1.2.1. Taux de 17-OHP de base :

Les taux de 17-OHP de base sont compris dans la fourchette 26.7- 1678 nmol/l avec une répartition relativement régulière, la moyenne étant à 434.5 nmol/l.

1.2.2. Taux de rénine

Les taux de rénine sont compris entre 14 et 3620 ng/l avec une moyenne à 481.5 ng/l tandis que l'activité rénine plasmatique est entre 1.7 et 210 ng/ml/h avec une moyenne à 60.2 ng/ml/h.

TABLEAU 12 : Données clinico-biologiques des patients atteints de forme classique

Patients	Mutation nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Phénotype	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) buvard plasma B/S	 renin R (ng/l) ARP (ng/100ml/h)	 ACTH (ng/l)	 T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
1 M	p.M1V c.1A>G	Large lésion	SW	DNN	PSC J10	Buvard 256 B=1121 (J11)	R = 3200 (J11)	-	-
2 F	p.M1L c.1A>C	IVS2-13A/C>G	SW / SV	DNN	Prader 4	B= 800 (J3)	R = 26 (J3)	510	
3 F	p.M1L c.1A>C	p.R483P	SW / SV	1er mois	Prader 4	B= 135 (B)	ARP = 5748	-	-
4 M	p.M1T c.2T>C	p.M1T	SW	J10	PSC	B = 491 (J11)	R = 145	40	0.4
5 F	p.Y59N c.175T>A	IVS2-13A/C>G	SW / SV	1M DNN (FN)	Prader 1 PSC	B = 152 (1M)	-	-	-
6 M	p.H62L c.185A>T + p.P30L	p.H62L + p.P30L	SV	6 A 10 M	-	B = 1678 S = 1809	ARP = 4600	114	-
7 F	p.H62L + p.P30L	p.I172N	SV	2 M	Prader 1	B = 112	R = 800	-	0.71 7.8
8 M	p.H62L + p.P453S	p.Q318X + p.R356W	SV	7 A	AO 11A6M/AC 7A PP acné	B = 350 S = 471	-	16.9	2.6 19.6
9 F	p.H62L + p.P453S	p.I172N	SV	18 M	Prader 1, PP AO 16A / AC 11A	B = 360	-	-	5.4 10.5
10 F	p.H62L + p.P453S	Large lésion	SV	7 A	Prader 1, PP Aménorrhée I	B = 115.1 S = 345.4	-	67	4.76
11 F	p.H62L + p.P453S	p.I172N	SV	3 M	Prader 2	B = 224.2	ARP = 1110	-	3.3 25.7
12 F	p.H62L + p.P453S	IVS2-13A/C>G	SV	11 A	Prader 3, voix rauque hirsutisme	B = 159	-	-	15 39.6
13 M	p.H62L + p.P453S	IVS2-13A/C>G	SV	4A 3M	AO 9-10A / AC 4.3 A PP pénis=8 cm	B= 348	R = 45	-	2.75 20
14 M	p.H62L + p.P453S	p.Q318X	SV	10A 6M	AO 14A / AC 10.6	B = 460.5	-	-	-
15 F	p.H62L + p.P453S	p.Q318X	SV	7A 6M	Prader 1 AO11.6 / AC 7.6	B = 787.8	-	-	-
16 F	p.I77T c.230T>C	IVS2-13A/C>G	SV	1 A	Prader 1-2. P2-P3	B = 540 (1A) 17.5	R = 115 (1A)	195 (1A)	3.9
17 F	p.I77T	p.R483Pfs	SV	3.4A	Prader 3, P3 AO 8A/AC 3.4 A	B=180 (3.4A) 11.5	R = 56 (3.4A)	215 (3.4A)	6
18 M	p.I77T	Large lésion	SV	DNN	-	Buvard = 59 B=203 (J12)	R = 122	-	-
19 F	p.I77T	p.G110Efs	SV	9A	Prader 1 Ménarche 9ª Taille finale=1.50 m	-	-	-	-
20 M	p.I77T	p.R356W	SV	7.6 A	AO?/AC 10A PP	B = 23.3 (7.6A)	R = 74 (7.6A)	-	1.8

Patients	Mutation nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Phénotype	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) buvard plasma B/S	 renin R (ng/l) ARP (ng/100ml/h)	 ACTH (ng/l)	 T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
21 M	p.I77T	p.R356W	SV	10 A	AO13/AC 10.8 P4-P5	B=196.9 S=369.6	R=39	-	5.6
22 F	p.W116R c.346T>A	p.Q318X	SW/SV	naissance	Prader 4 -5	B = 46.5 (J0)	ARP = 15000	84	6.7
23F	p.H119R c.356A>G	p.I172N	SV	1 an	Prader 3 PP/AO/AS PSB	-	-	-	-
24 F	p.R132C c.394C>T + IVS2-13A/C>G	Conv ext 5’	SV	Naissance	Prader 4	B = 200	ARP = 950	-	-
25 F	p.L167P c.500T>C	IVS2-13A/C>G	SW / SV	DNN	Prader 4	Buvard = 762	R = 1056 (J3)	1121	-
26 M	p.L167P	IVS2-13A/C>G	SW / SV	DPN	-	B = 639	R = 52.4 (J2)	-	-
27 F	p.L167P	p.L167P	SW / SV	DPN	Prader 4	Buvard = 406 B = 279 (J1)	R = 166 (J1)	492 (J1)	4 20
28 F	p.Y259H c.775T>C + IVS2-13A/C>G	p.R356W	SW	-	Prader 3, PSC	-	-	-	-
29 M	p.A265V c.794C>T + p.Q318X	p.I172N	SV	DNN	PSC J11	B = 212 (J11)	R = 385	-	-
30 M	p.A285E c.854C>A	p.I172N	SW / SV	DNN	-	-	-	-	-
31 M	p.G291S c.871G>A	IVS2-13A/C>G	SW	DNN	PSC	Buvard = 324, B = 651 (j ?)	R = 1095 ng/l	-	-
32 M	p.G291S	Large lésion	SW	DNN	PSC		-	-	-
33 F	p.G291S	Large lésion	SW / SV	naissance	Virilisation des OGE	B = 150	R = 142 ng/l	-	-
34 M	p.G291S	Large lésion	SW	naissance	-	B = 1300 (J ?)	ARP = 11 000	-	-
35 M	p.G291S	Large lésion	SW	DNN	PSC	Buvard = 274 B = 786	R = 410 ng/l (J7 ?)	-	-
36 F	p.G292D c.875G>A	Large lésion	SW / SV	naissance	Prader 4, PSC	-	-	-	-
37 F	p.F306V c.916T>G + p.V281L	IVS2-13A/C>G	SV	naissance	Prader 5	-	-	-	-
38 M	p.E320K c.955G>A	p.I172N	SW / SV	5.6A	Pilosité pubienne, BA10A/CA 5A	B = 127 (5A) 24.4	-	-	4.2

Patients	Mutation nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Phénotype	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) buvard plasma B/S	 renin R (ng/l) ARP (ng/100ml/h)	 ACTH (ng/l)	 T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
39 F	p.R341P c.1022G>C	Large lésion	SV	J15	Prader 2	Buvard = 90.6 B = 396	R = 1310	56.4	
40 M	p.R341P	Large lésion	SV	6.6A	PP AO	-	-	-	-
41 F	p.R341P	Conversion intragénique	SV	5 J	Prader 4 Taille 1.47	B = 1500 (5j)	-	-	2.2
42 M	p.R341P	IVS2-13A/C>G	SV	-	-	B = 160.6 (J15) 16.2	R = 275	-	-
43 M	p.R341P	p.R356W	SV	DNN	-	Buvard = 440	R = 320	155	-
44 M	p.R341P	p.Q318X	SV	5.8 A	PP AO	B = 276 (5.8A)	-	augmentée	-
45 M	p.R341P	p.R341P	SV	5.1 A	-	B = 136 (5.1A)	R = 760	-	-
46 F	p.R341P	p.R341P	SV	1.8 A	-	B = 81 / S = 378 (1.8A)	R=61	-	-
47 F	p.R341W c.1021C>T	Large lésion	SV	5.2A	Prader 4, AS	B = 210 / S = 447	R = 24.4	-	-
48 M	p.L342P c.1025T>C	Large lésion	SW / SV	DNN	-	B = 26.7 (J9)	R = 278	96	2.9
49 F	p.R354C c.1060C>T	Conv ext 5’	SW	3.5A	Prader 1, PP, AS	B = 805 / S = 993	R = 70	-	11 5.4
50 F	p.R354C	IVS2-13A/C>G+P453S	SW	-	Prader 5	B = 353	R = 2653	-	-
51 M	p.R354P c.1061G>C	IVS2-13A/C>G	SW	1er mois	PSC	-	-	-	-
52 F	p.R354H	IVS2-13A/C>G	SV	DNN	Prader 2	Buvard = 85 B = 150 (J9)	R = 587	-	-
53 F	p.R354H	p.I172N	SV	DNN	Prader 3	Buvard = 468 B = 303 (J4)	R = 165 (J4)	-	-
54 F	p.H365Y c.1093C>T	p.R483Pfs	SW	-	Prader 3-4	Buvard = 89.9	-	-	-
55 F	p.P386R c.1157C>G	p.R316X	SW / SV	-	-	-	-	-	-
56 M	p.N387I c.1160A>T	Large lesion	SW	J8	-	-	-	-	-
57 F	p.N387I	p.R356W	-	naissance	-	-	-	-	-
58 F	p.R408C c.1222C>T	IVS2-13A/C>G+ Promoteur	SW / SV	naissance	Prader 4 PSC	B = 450 (J3) 52.5	R = 65 (J3)	48.0	-
59 M	p.R408C	IVS2-13A/C>G+ Promoteur	-	DPN	-	-	-	-	-

Patients	Mutation nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Phénotype	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) buvard plasma B/S	 renin R (ng/l) ARP (ng/100ml/h)	 ACTH (ng/l)	 T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
60 M	p.R408C	p.Q318X	SW	naissance	PSC	Buvard = 680 B = 258	R=334 (J9)	-	9.9
61 F	p.R408C	p.R408C	SW	10 semaines	Prader 1, PSC sur garstroentérite	B = 453 (1A)	R = 77 (1A)	-	12.3 52.5
62 F	p.F421L c.1263C>A	p.Q318X	SW / SV	7 mois	Prader 1		-	-	-
63 M	p.G424S c.1270G>A	Large lésion	SV	5A	AO PP	B=150 sous tt	-	-	-
64 F	p.G424S	p.I172N	SV	4.3 A	Prader 1, PP AO 7.8 /AC 4.3Ans	B = 678/926	-	-	-
65 M	p.G424S	IVS2-13A/C>G	SW / SV	DNN		B = 246	-	-	-
66 F	p.G424S	IVS2-13A/C>G	-	3A	Prader 1	B = 246	-	-	-
67 F	p.G424S	p.Q318X	SV	3M	Prader 3	↑ 17 cétostéoïdes et prégnantiol	-	-	-
68 F	p.G424S	IVS2-13A/C>G +p.P453S	SW / SV	-	Prader 3	B = 244 sous tt	-	-	-
69 M	p.G424S + p.V281L	p.R483Q+ p.V281L	SW / SV	-	-	-	-	-	-
70 M	p.R426H c.1277G>A	IVS2-13A/C>G	SW	naissance	-	B=470(J8)	ARP>4000	-	48.0
71 F	p.R426H	p.I172N	SV	3A	-	-	-	-	-
72 F	p.R426H	p.I172N	-	-	-	-	-	-	-
73 M	p.R426H	p.I172N	SV	5A	AO PP	-	-	-	-
74 M	p.R426H	p.I172N	-	3A	-	-	-	-	-
75 M	p.R426H	p.I172N	SV	4.4A	-	B = 800	R = 117	-	-
76 M	p.R444P c.1331G>C	p.Q318X	SW / SV	DNN?	-	B = 1040 ng/ml? (J10)	-	-	-
77 M	p.R483W c.1447C>T	Large lésion	SV	6 ans	AO PP	B = 363	ARP = 1420	-	-
78 F	p.R483W + p.Q318X	p.R483P	SW	DNN	PSC Prader 4	B = 172	R = 90.1	-	-
79 M	p.R483W + IVS2-13A/C>G	IVS2-13A/C>G+ p.Q318X	SW	-	-	-	-	-	-
80 F	p.R483P c.1448G>C	Large lésion	SW	1er mois	PSC	B = 190	-	-	-

Patients	Mutation nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Phénotype	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) buvard (nmol/L) plasma B/S	renin R (ng/l) ARP (ng/100ml/h)	ACTH (ng/l)	T (nmol/L) Δ4A
81 F	p.R483P	Conv ext 5’	-	Naissance	Prader 2	Buvard = 46 Nale B = 148 (J1)	R = 39.8	118	1.4
82 M	p.R483P	p.I172N	SV	5A 6M (FN)	PPP	Buvard = 68 B = 247.8 (5A 6M)	-	-	-
83 M	p.R483P	IVS2-13A/C>G	SW	DNN	PSC	Buvard = 130 pg/tâche B = 156	ARP = 21000	-	-
84 M	p.R483P	IVS2-13A/C>G	SV	3 Ans	PP/AO/AS	-	-	-	-
85 M	p.R483P	Large lésion	SW	1er mois	PSC	B = 666.6	R = 263	-	-
86 M	p.R483P	Large lésion	SW	DNN	PSC	Buvard =142 B = 630 (J10)	R = 2467	-	-
87 M	p.R483P	IVS2-13A/C>G	SW	J21	PSC	B = 1330.17 (J21)	-	-	-
88 M	p.R483P	p.I172N	SV	39 Ans	-	B = 154.53	ARP normal	200	-
89 F	p.R483P	IVS2-13A/C>G	SW	1er mois	Prader 2	B = 166.65	R = 270	162	-
90 M	p.R483P	p.I172N	SV	3 Ans	PPP	-	-	-	-
91 F	p.R483P	IVS2-13A/C>G	SW	naissance	PSC	-	-	-	-
92 F	p.R483Q c.1448G>A	IVS2-13A/C>G	SV	6 ans	Prader 1 PPP Pub cent PSC	B = 330 (6A)	-	-	-
93 F	p.R483Q + p.V281L	IVS2-13A/C>G	SV/SW	14 Ans	-	-	-	-	-
94 F	p.W19X c.56G>A	IVS2-13A/C>G	SW	DNN	Prader 4 PSC	Buvard = 278 B = 266	R =3620 (J14)	1252	Aldo = 2977
95 M	p.W19X	Large lésion	SW	DNN	PSC (DCD)	Buvard=310 B=606 (J12)	ARP>7400	1900	-
96 M	p.W19X	p.I172N	SV	5A2M	PPP, PSB	B=698	ARP = 1330	-	-
97 F	p.W19X	p.I172N	SV	2M 15J	Prader 2	B= 982	ARP>15000	135	-
98 F	p.W19X	p.I172N	-	DPN	-	Buvard = 384 B=192.4	ARP = 18000	-	-
99 M	p.W19X	p.I172N	-	DPN	-	B >60.5	R = 68	162	-

Patients	Mutation nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Phénotype	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) buvard plasma B/S	 renin R (ng/l) ARP (ng/100ml/h)	 ACTH (ng/l)	 T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
100 F	p.W21X	p.I172N	SV	naissance	Taille: 1.61 Poids 81	-	-	-	-
101 M	p. W22X c.66G>A	IVS2-13A/C>G	SW	-	-	-	-	-	-
102 F	p.I46Nfs c.352dupA	p.Q318X	SW	naissance	Prader 4	-	-	-	-
103 M	p.L166Pfs c.496-497del	Large lésion	SW	naissance	PSC	-	-	-	-
104 M	p.W204X c.611G>A	Large lésion	SW	-	-	-	-	-	-
105 F	p.R225Gfs c.675del	homozygote	SW	DNN	PSC (J2)-Prader 4	DNN = 244 B =195	R = 140	-	-
106 M	p.Q228X c.682C>T	IVS2-13A/C>G	SW	naissance	PSC	-	-	-	-
107 F	p.Q228X	p.R316X	SW	1°M	Prader 4	B = 840	-	-	-
108 F	p.Q228X	IVS2-13A/C>G	SW	DNN	Prader 3	B =75.75(J1)	-	-	aldo = 700 pmol/l
109 M	p.Q228X	Délétion	SW	1°M	PSC	Buvard = 495 B =575.7	ARP = 3900	-	-
110 M	p.R444X c.1330C>T	Large lésion	SW	DNN ?	-	-	-	-	-
111 F	p.H280Tfs c.837del	IVS2-13A/C>G	SW	1er mois	PSC, Prader 4	-	-	-	-
112 M	p.Y336Lfs c.1005dup	Large lésion	SW	DNN	PSC (J13)	B =1403	R = 462	-	aldo = 1573 Δ4: 38.4
113 M	p.H392Pfs c.1174dupC	IVS2-13A/C>G	SW	1er mois	-	-	-	-	-
114 F	p.G413Afs c.1238del	p.R356W	SW	-	PSC	-	-	-	-
115 M	p.F217-K245 del c.649-735del	Large lésion	SW	DNN	PSC	DNN = 358 (J9)	-	-	-
116 M	p.V427-C428del c.1279-1284del	Conv intra -génique	SW	DNN	PSC(J9)	B =564	ARP = 171	1159	-

Patients	Mutation nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Phénotype	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) buvard plasma B/S	renin R (ng/l) ARP (ng/100ml/h)	ACTH (ng/l)	T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
117 F	p.V427_C428del c.1279_1284del	IVS2-13A/C>G	-	1er mois	Prader 5	B = 303	-	-	-
118 M	p.Ser460_Pro465del c.1378_1395del18	IVS2-13A/C>G	SW	7 j	PSC	-	-	-	-
119 F	p.Ser460_Pro465del	IVS2-13A/C>G	DCD à J20	-	-	-	-	-	-
120 F	p.Ser460_Pro465del	IVS2-13A/C>G	SW	DNN	Prader 3 PSC	B =142.4 (J0)	R = 46	-	15 15
121 M	p.D407Vfs c.1220_1485del	IVS2-13A/C>G	SW	DNN	-	DNN = 339 B =112 (J5)	-	-	-

2. Patients avec une forme non classique

Parmi les 1500 patients atteints de formes non classiques, 112 (7.5 %) portent une mutation rare du gène *CYP21A2*. Comme ceci est habituel dans la forme non classique, la majorité des patients est de sexe féminin, les hommes étant en général asymptomatiques. Contrairement à la forme classique, la virilisation des organes génitaux externes est absente ou modérée et alors limitée à une hypertrophie clitoridienne régressant les premiers mois de vie. Cette forme n'est en général pas dépistée à la naissance et il n'y a pas de syndrome de perte de sel. Les 112 formes non classiques avec une mutation rare sont présentées dans le tableau 13.

2.1. Bilan des données cliniques

Les patients symptomatiques dans l'enfance l'ont en général été plus tard que dans la forme classique. Les filles comme les garçons diagnostiqués dans l'enfance, présentent des premiers signes entre 5 et 8 ans, soit une pilosité pubienne, une avance de l'âge osseux, la combinaison des deux donnant une pseudo-puberté précoce.

Chez l'adolescente ou la femme adulte, les principaux signes d'appel sont la dysménorrhée, l'hirsutisme et l'infertilité.

2.2. Bilan des données biologiques

Il existe une grande disparité au sein des valeurs de 17-OHP de base qui s'échelonnent entre 0.9 nmol/l et 666.1 nmol/l avec une moyenne à 55.7 nmol/L ; les pics de 17-OHP sous ACTH sont compris entre 36.4 et 478 nmol/l avec une moyenne à 135 nmol/l.

TABLEAU 13 : Données clinico-biologiques des patients atteints de forme non classique

Patients	Mutation avec nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) plasma B/S	 21DF pg/ml B / S	 T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
1 M	p.G35A c.104G>C	p.V281L	23 A	hypoglycémies	B= 74.2 S = 78.9	1960 5907	-
2 F	p.G35D c.104G>A	IVS2-13 A/C>G	-	Asymptomatique	B=119	-	-
3 F	p.H38L c.113A>T	Large lésion	15 A	Aménorrhée I Hirsutisme	B= 66 (15A) S = 155	-	-
4 F	p.H38L	Large lésion	12A	Hirsutisme AO	B= 2 (12A) S = 233	-	-
5 F	p.H38L	p.I172N	13 A	Hirsutisme	B = 0.9 S = 45.4	-	-
6 F	p.H38L	p.I172N	-	-	-	-	-
7 F	p.H38L	p.I172N	-	-	-	-	-
8 F	p.H38L	p.V281L	26 A	Surpoids	B = 19.2 S = 194.7	-	-
9 F	p.H38L	IVS2-13 A/C>G	-	Infertilité	B = 112	-	1.47 14.6
10 F	p.H38L	IVS2-13 A/C>G	16 A	Hirsutisme Dysménorrhée	B=36.4 S = ?	-	-
11 F	p.H38L	p.V281L	6A 6M	PPP	B = 15.7 S = 95.7	-	-
12 F	p.H38L	p.V281L	-	-	B = 81.5 S = 336.4	-	-
13 F	p.H38L	IVS2-13 A/C>G	23 A	Hirsutisme Dysménorrhée		-	-
14 F	p.H38L	p.V281L	32 A	Hirsutisme	B = 23 S = 113	-	2.7 23
15 F	p.H38Y c.112C>T	p.V281L	-	Infertilité	B = 20.3 S =115.1	-	-
16 F	p.P42H c.125C>A +p.V281L	p.V281L	22 A	Acné Hirsutisme	B=87.87 S=163.62	-	-
17 F	p.Y47C c.140A>G	Promoteur 2 / 4	21 A	Hirsutisme Dysménorrhée	B = 41 S =192	-	-
18 F	p.H62L c.185A>T	Large lésion	26 A	Dysménorrhée	B = 69 S =108	-	4.8 17.1
19 M	p.H62L	p.I172N	6/0.1 (apparenté à un SV)	AO 7.6/CA 6	B = 48	-	4.18 3.9
20 F	p.H62L	p.V281L	33A	-	B = 28.4 S =122.3	-	3.6 13.6
21 F	p.H62L + p.P453S	p.V281L	11A	Hirsutisme Acné	B= 21.2 S = 238.2	-	 15.7

Patients	Mutation avec nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) plasma B/S	 21DF pg/ml B / S	 T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
22 F	p.H62L + promoteur	IVS2-13A/C>G	18 A	Aménorrhée I Hirsutisme	-	-	-
23 F	p.H62L + promoteur	Large lésion	20 A	Hirsutisme	-	-	-
24 F	p.I77T (c.230T>C)	p.V281L	-	-	B=29.24 S=121.2	-	-
25 F	p.P92T c.274 C>A	Large lésion	-	-	B = 4.5 S =50.3	-	-
26 F	p.P92H c.275C>A	Large lésion	-	-	B=160	-	-
27 F	p.Y112C c.335A>G	Large lésion	12A	Hirsutisme, acné, obésité Dysménorrhée	B = 7.2 S = 123	-	6.4 18.2
28 M	p.S113A c.337T>G	p.V281L	9A6M	AO	B = 3.6 S = 68.8	-	-
29 F	p.S113A	p.V281L		Hirsutisme	B = 8.5 S = 79.1	-	-
30 F	p.S113Y c.338C>A	p.V281L	16A	Hirsutisme acné	B = 17.9 S = 148.5	-	1.2 4.4
31 F	p.S165F c.494C>T	Conversion intragénique	33 A	infertilité	B = 4.6 S = 97.7	-	-
32 F	p.S165F	Conversion intragénique	-	-	-	-	-
33 F	p.L166P c.497T>C	p.V281L	5 A	PP AO	B = 21.2 S = 193.9	-	-
34 F	p.I171S c.512 T>G	p.Q318X	6A 3M	AS AO	 S = 309.1	-	-
35 M	p.I171S	p.Q318X	8A 3M	AS AO acné	B = 17.5 S = 142.4	B = 560 S =17000	0.2 0.77
36 F	p.L198F c.594 A>T	p.V281L	23A	Hirsutisme Spanioménorrhée	 S = 44.6	-	-
37 F	p.H203Y c.607C>T	IVS2-13 A/C>G	21 A	Hirsutisme acné	B = 135	-	1.4 11
38 F	p.H203Y	p.V281L	29 A	Dysménorrhée	 S = 190.9	-	-
39 F	p.H203Y	p.V281L	20 A	Hirsutisme Dysménorrhée	B = 8.8 S = 100.9	-	-
40 F	p.H203Y	p.R356W	30 A	Hirsutisme acné	B = 24.2 S = 247.9	-	-
41 F	p.H203Y	p.V281L	27 A	Hirsutisme	B = 17.6	-	0.8 2.9
42 F	p.I212T c.635T>C	Large lésion	adulte	Hirsutisme	B = 26.7	-	0.9 6.9
43 F	p.I212T	IVS2-13 A/C>G	-	Spanioménorrhée	B = 60.6 S = 151.5	-	-

Patients	Mutation avec nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) plasma B/S	 21DF pg/ml B / S	 T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
44 F	p.I212T	Large lésion	6 A	AO PP	B = 84	-	-
45 F	p.I212T	Large lésion	30 A	Hirsutisme acné	B = 21 S = 200	-	0.8 3.5
46 M	p.I212T	Triple mutation	6 A 3 M	AO PP	B = 38.8	-	-
47 F	p.I212T	p.V281L	26 A	Hirsutisme Dysménorrhée	B = 14.9	-	-
48 F	p.I212T	p.V281L	25 A	Hirsutisme	B = 26.6 S = 102.1	-	-
49 F	p.I230T c.689T>C	IVS2-13 A/C>G	17 A	Hirsutisme Dysménorrhée	B = 34 S = 136	-	-
50 F	p.D234E c.702T>G	IVS2-13 A/C>G	-	Hirsutisme Dysménorrhée	B = 69.7 S = 136.3	-	-
51 F	p.D234E	IVS2-13 A/C>G	22 A	-	 S = 43	-	-
52 F	p.V249A c.746T>C	p.V281L	-	Hirsutisme	B = 4.7 S = 60.6	-	0.4 2
53 M	p.M260V c.778A>G	p.V281L	9A 6M	AO PP	B = 13.9 S = 69.7	-	-
54F	p.V281M c.841G>A	p.V281L	23 A	Hirsutisme Dysménorrhée	B = 30 S = 90	-	-
55 F	p.M283V c.847A>G	p.V281L	-	-	-	-	-
56 F	p.M283V + IVS1+44G>A?	p.V281L	-	-	-	-	-
57 F	p.M283V	p.I172N	-	-	-	-	-
58 F	p.L288H c.863T>A	p.V281L	25 A	Hirsutisme Dysménorrhée	B = 60.6 S = 122	4635 0.83 8599	-
59 F	p.V304M c.910G>A	Promoteur	-	PP	B = 3.2 S = 65.1	 16594	-
60 F	p.V304M	p.V304M + promoteur	-	Hirsutisme	B = 10 S = 60	 7600	-
61 F	p.L317M c.949C>A	IVS2-13 A/C>G	23 A	Hirsutisme Dysménorrhée	B = 12.1 S = 105.5	-	 0.5
62 F	p.L317M	p.V281L	15 A	Acné	B = 21.8 S = 45	-	-
63 F	p.Y336C c.1007A>G	Large lésion	26 A	Dysménorrhée Alopécie	B = 53 S = 103	-	-
64 M	p.Y336C	Large lésion	33 A	-	-	-	-

Patients	Mutation avec nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) plasma B/S	 21DF pg/ml B / S	 T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
65 F	p.R339C c.1015C>T	p.V281L	36 A	Infertilité	B = 5.9 S = 72	5771	-
66 F	p.R339H c.1016G>A	Large lésion	-	-	-	-	-
67 F	p.R341P c.1022G>C	p.V281L	-	Infertilité, acné, hirsutisme	B = 51.5 S = 90.9	-	-
68 F	p.R341P	p.V281L	-	Prader 1	B = 238 S = 478	23 444	-
69 F	p.R341W c.1021C>T	IVS2-13 A/C>G	-	PP	B = 90.9 S = 303	-	-
70 F	p.R341W	p.V281L	-	-	-	-	-
71 F	p.R341W	p.I172N	-	PP Aménorrhée I	B = 312.1	-	2.2 9.2
72 F	p.R341W	Large lésion	-	-	-	-	-
73 F	p.R341W	L307Ffs	-	-	B = 666.6	-	-
74 F	p.R354C c.1060C>T	p.V281L	9A 2M	PP AO S2	B = 25 S = 165	-	1.6
75 F	p.R356Q c.1067G>A	p.V281L	-	Hirsutisme	B = 30.3 S = 141.2	-	-
76 F	p.R356Q	p.V281L	-	Hirsutisme	B = 8.8 S = 54.5	-	-
77 F	p.R356Q	p.V281L	7A 6M	PP AS	-	-	-
78 F	p.V358I c.1072G>A	p.V281L	11A	PP	B = 6.1 S = 75.7	-	-
79 F	p.A391T c.1171G>A	p.I172N	23 A	Hirsutisme	B = 3.3 S = 42.4	-	-
80 F	p.R408C	p.P453S	-	Spanioménorrhée Hirsutisme	B = 57.3	-	-
81 F	p.R408C	p.V281L	23 A	Hirsutisme	B = 63.6	-	-
82 F	p.R408C	p.V281L	19 A	-	B = 39.4 S = 87.8	-	4.1 15.1
83 M	p.R408C	p.V281L	8 A	AO PP	B = 64.2 S = 132	-	-
84 F	p.R408C	p.V281L	14 A	Hirsutisme	B = 75.7 S = 112.1	-	-
85 F	p.R408C	Conv de l'extrémité 5'	SV	-	-	-	-
86 M	p.R408H c.1223G>A	Large lésion	11 A	AO PP	B = 36.3 S = 60.6	-	-
87 F	p.G424S c.1270G>A	p.V281L	16 A	-	B = 15.7 S = 151.5	-	-

Patients	Mutation avec nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) plasma B/S	 21DF pg/ml B / S	 T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
88 F	p.G424S	p.V281L	7.6 A	PP	B = 78 S = 198	2179 8417	0.52 3.64
89 F	p.R435C c.1303C>T	p.Q318X	-	Spanioménorrhée Hirsutisme	B = 84.8 S = 160.6	-	-
90 F	p.R435C	IVS2-13 A/C>G	34 A	Hirsutisme Dysménorrhée	 S = 303	-	-
91 F	p.G455R c.1363G>A	p.V281L	29 A	Hirsutisme Dysménorrhée	B = 3.03 S = 39.4	-	-
92 F	p.L461P c.1382T>C	p.V281L	5 A	PP	B = 4.76 S = 90.9	-	-
93 F	p.S468G c.1402A>G	p.V281L	18 A	-	B=2.81 S=47	-	-
94 F	p.P475L c.1424C>T	IVS2-13A/C>G	9 A	-	B = 257 S = 361	4905 11945	-
95F	p.P482S c.1444C>T	IVS2-13 A/C>G + p.P453S	8 A	PP AO	B = 20 S = 70.3	-	-
96 F	p.P482S	p.V281L	22 A	Hirsutisme Dysménorrhée	B = 6.7 S = 40.0	-	-
97 M	p.P482S	p.V281L	14 A	PP AO	B = 2.7 S = 36.4	-	-
98 F	p.P482S + p.P30L	p.V281L	7.6 A	-	B = 9.8 S = 107.1	428 11289	-
99 F	p.R483P c.1148G>C	p.P30L	30 A	-	-	-	-
100F	p.R483P	p.V281L	7A 9M	-	B = 53	-	-
101 F	p.R483P	p.V281L		-	-	-	-
102 M	p.R483P	p.V281L	8A 2M	AS acné	B = 148	-	-
103 F	p.R483P	p.V281L	38 A	asymptomatique	-	-	-
104 F	p.R483P	p.V281L	6A 6M	AS AO	B = 60.6 S = 163.6	-	-
105 F	p.W19X	p.V281L	-	-	-	-	-
106 M	p.W19X	p.V281L	-	-	-	-	-
107 F	p.W19X	p.V281L	16 Ans	Hirsutisme, troubles règles, acné	B=84.84 S=139.38	-	0.99 8.9
108 F	p.R316X c.946C>T	p.V281L	DNN	-	B= 5.15 (J15) S=272.09	-	-
109 M	p.R316X	p.V281L	naissance	-	B=12.12	-	-
110M	p.Ser460_Pro465del c.1378_1395del18	p.P453S	2A	Asymptomatique Déshydratation	B= 35* stress+++	-	-

Patients	Mutation avec nomenclature - protéique - nucléotidique	Autre allèle	Age du diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP (nM) plasma B/S	21DF pg/ml B / S	T (nmol/L) Δ4A (nmol/L)
111 F	p.Ser460_Pro465del	p.V281L	16A	Hirsutisme	B= 221.19	-	-
112 F	p.Ser460_Pro465del	p.V281L	30A ?	-	B=30.3 S=112.11	-	-

3. Patients atteints d'une forme difficile à classer d'après le phénotype.

Nous avons eu des difficultés à classer 10 patients, 5 filles et 5 garçons, dans l'un des deux groupes précédents d'après leur seul phénotype (tableau 14). Tous portaient une mutation sévère connue sur l'autre allèle. Soit la sévérité du phénotype était variable en fonction des patients avec une même mutation rare (cas des patients 1-4 ; 6-7), soit elle ne permettait pas de trancher formellement entre formes classique et non classique. Ces données nous ont amené à considérer ces quelques patients dans un groupe à part et à nous baser sur les données de la littérature et les études fonctionnelles pour progresser.

TABLEAU 14 : Données clinico-biologiques des patients atteints d'une forme difficile à classer

Patients	**Mutation** **Nomenclature** **- protéique** **- nucléotidique**	**Autre allèle**	**Age du diagnostic**	**Symptômes**	**Dosages** **17-OHP (nM)** **Buvard (nmol/L)** **plasma B/S (nmol/L)**	**rénine (ng/l)** **ARP (ng/100ml/h)**	**T** **Δ4A**
1 F	p.G178R c.532G>A	p.R356W	6.10 A	Prader 1 AO	B = 206.6 S = 272.7	-	-
2 F	p.G178R	p.R356W	7.11 A	PP	B = 81.8 S = 293.9	-	-
3 M	p.G178R	p.I172N	1 M	-	B = 216	-	-
4 M	p.G178R	IVS2-13A/C>G	-	-	-	-	-
5 F	p.I230T c.689T>C *+p.V281L*	Large lésion	DNN	Décès sur GEA	-	-	-
6 M	p.S301Y c.902C>A	IVS2-13A/C>G	-	-	-	ARP = 460	-
7 M	p.S301Y	Del 8 pb	DNN	-	Buvard = 150 B = 112	R = 181	-
8 F	p.R339H+p.P453S	Large lésion	2A 6M	-	B = 1077	R = 514	0.59 3.14
9 F	p.R369W c.1105C>T	IVS2-13 A/C>G	DNN	AO 6A / AC 3A 1M	B = 227	R = 195	-
10 F	p.R369W	p.Q318X	9A	Hirsutisme Taille finale=1.54 m	B = 11 S = 159	-	2.5 11
11 M	p.R149H c.446G>A + p.P453S	Large conversion	9 A	Avance staturale Taille finale = 1.70 < taille cible	-	-	-

4. Simples hétérozygotes

Ils sont présentés dans le tableau 15.

4.1. Critères diagnostiques des hétérozygotes étudiés

Le diagnostic d'hétérozygotie a été posé dans trois circonstances :

1. Signes évocateurs de forme non classique mais taux de 17-OHP sous ACTH inférieur au seuil diagnostique (seuil fixé à 36 nmol/l dans le laboratoire) et une seule mutation détectée lors du génotypage ;
2. Sujets apparentés à un déficit en 21-hydroxylase ou à un simple hétérozygote ;
3. Conjoints explorés dans le cadre du conseil génétique :

- conjoints de patients avec une forme classique

- conjoints de patients atteints d'une forme non classique avec une lésion sévère identifiée sur un des deux allèles

- conjoints de simples hétérozygotes porteurs d'une lésion sévère.

En règle générale, le dépistage d'hétérozygotie chez les conjoints repose sur le dosage du 21-désoxycortisol sous ACTH. Le seuil a été abaissé dans le temps suite aux résultats des explorations moléculaires : initialement à 700 pg/ml (Fiet et al., 1988) il a été abaissé à 500 pg/ml (Forest et al., 1994) pour être actuellement fixé à 400 pg/ml (Tardy et al., 2005). Par ailleurs, certains conjoints ont été génotypés directement sans dépistage biologique préalable.

4.2. Résultats

Au sein de notre cohorte de 1150 suspects d'hétérozygotie d'après les résultats du test à l'ACTH, 920 ont été dépistés par dosages du 21-désoxycortisol et 230 par dosage de la 17-OHP.

Concernant les 920 sujets, le pic maximal de 21-désoxycortisol était compris entre 460 et 1914 pg/ml ; parmi les 1840 allèles étudiés, 412 portaient une mutation du gène *CYP21A2* et pour 24 il s'agissait d'une mutation rare.

Concernant les 230 sujets avec dosages de la 17-OHP sous ACTH, les taux se répartissaient de façon homogène entre 2.3 et 58.8 nmol/l ; la majorité des taux (150 sur 230) est comprise entre 15 et 36 nmol/L, seulement 40 taux sont inférieurs à 15 nmol/L et 40 sont compris entre 36 et 58.8 nmol/L. Parmi les 460 allèles séquencés, 188 étaient mutés et pour 8 d'entre eux il s'agissait d'une mutation rare.

Ainsi parmi les 1150 possibles hétérozygotes d'après le test à l'ACTH, 32 portent une mutation rare ce qui représente 2.8 % des sujets.

Par ailleurs, deux conjoints explorés sans test à l'ACTH (conjoints 9 et 33) ont été diagnostiqués hétérozygotes pour une mutation rare.

Les valeurs de 21-DF et 17-OHP trouvées chez les porteurs d'une mutation rare sont dans le tableau 15.

TABLEAU 15 : Données clinico-biologiques des hétérozygotes

Patients	Mutation Nomenclature -protéique -nucléotidique	Circonstances de diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP(nM) plasma B/S	 21-DF (pg/ml) sous ACTH
1 F	p.H38L c.113 A>T	Conjoint	-	B=1.39 S=7.94	836
2 F	p.R75K c.224 G>A	Suspicion de FNC	Puberté précoce	B=0.9 S=2.27	-
3 F	p.P92T c.274 C>A	Suspicion de FNC	Dysménorrhée infertilité	B=5.1 S=13.5	-
4 F	p.R124C c.370C>T	Suspicion de FNC	-	B=0.61 S=15.4	-
5 F	p.L198F c.594A>T+promoteur	Dépistage néonatal positif Evolution favorable	Aucun	 S=18	-
6 F	p.S202G c.604A>G	Suspicion de FNC	Prémature pubarche	B=3.9 S=11.7	-
7 F	p.S202G	Suspicion de FNC	Pilosité pubienne précoe	B=9.09 S=23.5	1480
8 F	p.I212T c.635T>C	Suspicion de FNC	-	B=1.3 S=13.6	843
9 M	p.I212T	Conjoint	-	-	-
10 M	p.I212T	Conjoint	-	-	931
11 F	p.N220S c.659A>G et p.R408H c.1223G>A	Suspicion de FNC	alopécie Aménorrhée secondaire hirsutisme	B=2.8 S=27.5	-
12 M	p.R233K c.698G>A	Conjoint	-	-	949
13 F	p.M239K c.716T>A	Suspicion de FNC	-	B=9 S=29.4	600
14 M	p.A265V c.794C>T	Conjoint	-	-	517
15 M	p.A265V	Conjoint	-	-	740
16	p.A265V	Suspicion de FNC	-	 S=17	649
17 F	p.V304M c.910G>A	Suspicion de FNC	-	B=3.5 S=16.3	1711
18 M	p.V304M	Suspicion de FNC	Prémature pubarche Avance âge osseux	B=1.7 S=16.3	893
19 F	p.H310N c.928C>A	Suspicion de FNC	-	-	562
20 F	p.H310N	Suspicion de FNC		B=2.9 S=9.8	568
21 F	p.R339H c.1016G>A	Suspicion de FNC	-	B=0.8 S=12	1074

Patients	Mutation Nomenclature -protéique -nucléotidique	Circonstances de diagnostic	Symptômes	Dosages 17-OHP(nM) plasma B/S	 21-DF (pg/ml) ACTH
22 F	p.R354C c.1060C>T	Suspicion de FNC	Acné avance âge osseux	B=0.91 S= 22.12	-
23 F	p.R356Q	Sœur d'une FNC	-	 S= 24.9	2850
24 F	p.R366H c.1097G>A	Conjointe	-	B=2.7 S=5.65	1073
25 F	p.A391T c.1171G>A	Suspicion de FNC	-	B=1.4 S=5.6	822
26 F	p.A391T	Suspicion de FNC		B=3.3 S=13.3	-
27 M	p.G455R	Conjoint	-	 S=7.7	1118
28 M	p.P482S c.1444C>T	Suspicion de FNC	Prémature pubarche	 S=9.9	1302
29 F	p.P482S	Soeur	Aucun	-	1500
30 F	p.P482S	Suspicion de FNC	-	-	661
31 M	p.P482S + p.P453S	Suspicion de FNC	-	B=2.21 S=21.88	1914
32 F	p.P482S	Suspicion de FNC	-	-	789
33 M	p.P482S	Conjoint	-	-	-
34 M	p.A391Gfs c.1171dupG	Conjoint	-	B= 5.79 S=15.5	693

II. Mutations rares identifiées chez les patients

Une mutation rare avec une fréquence <1% a été détectée sur environ 374 allèles parmi les 7000 portant une mutation du gène CYP21 (5.3%). Les 107 mutants rares identifiés sont soit récurrents (48) soit privés dans la plupart des cas (59). Plusieurs ont été estimés sévères étant des mutations non-sens, des mutations entraînant un décalage de cadre de lecture ou des réarrangements dont la sévérité est retenue alors que les mutations faux-sens impliquent en général des études fonctionnelles complémentaires.

1. Mutations dont la sévérité peut être déduite de leur nature

1.1. Mutations non-sens ou responsables d'un décalage du cadre de lecture

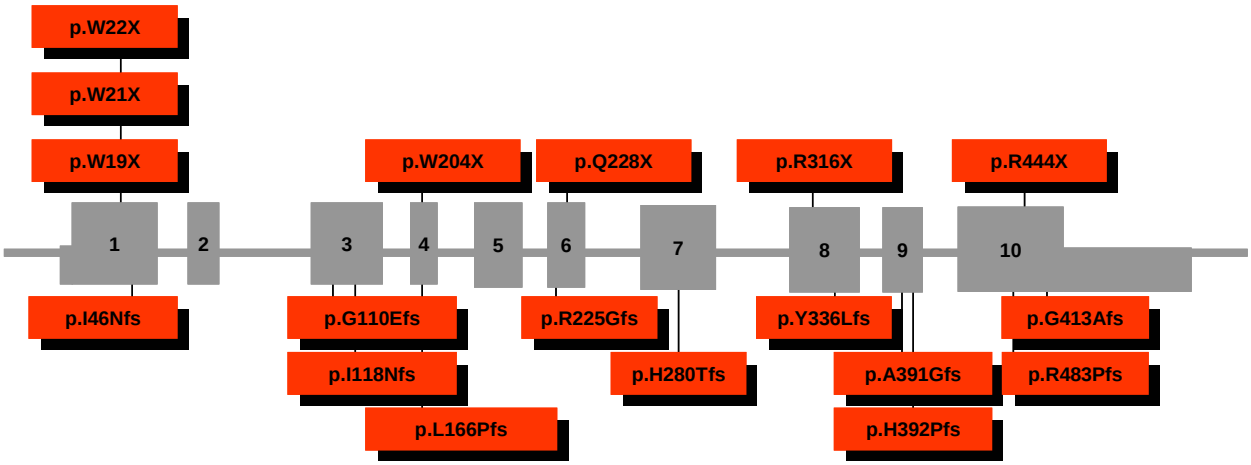


FIGURE 26 : Nouvelles mutations tronquantes sévères

Nous avons détecté **18 nouvelles mutations** non-sens ou responsables d'un décalage du cadre de lecture par délétion ou insertion d'un à deux nucléotides (figure 26). Dix-sept de ces mutations ont été identifiées chez 25 patients atteints de forme classique qui portent sur leur autre allèle une mutation sévère (P94 à P114) ou une nouvelle mutation faux-sens (P17, P19, P54, P55). La protéine qui en résulte est amputée d'une partie importante pour sa fonction, notamment la poche à cystéine (comprenant les acides aminés 420-428) et/ou les acides aminés nécessaires pour le repliement (R483), ce qui explique la répercussion très sévère de ces mutations.

Certaines mutations non-sens ont également été détectées chez 5 formes non classiques qui portent sur leur autre allèle une mutation modérée expliquant leur phénotype : p.W19X chez les

patients P105-107 et p.R316X chez les patients P108 et P109. Enfin, la mutation pA391Gfs a été détectée chez un simple hétérozygote (P34).

1.2. Délétions particulières

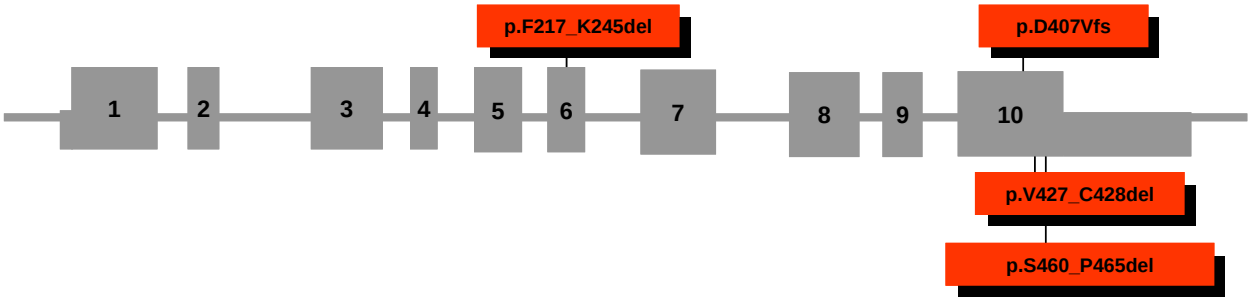


FIGURE 27 : Délétions particulières

Quatre délétions particulières, n'entraînant pas systématiquement de décalage du cadre de lecture, ont été identifiées (figure 27). Ces délétions sont présentes chez 7 patients atteints de forme classique (P115-121) qui portent une mutation sévère sur leur autre allèle. La sévérité de ces délétions qui respectent le cadre de lecture, peut être expliquée par la perte d'une région importante pour l'activité enzymatique.

Ainsi la délétion de l'exon 6 (p.F217_K245del) provoque la perte de l'hélice G impliquée dans la reconnaissance et l'entrée du substrat. La délétion des deux acides aminés 427-428 entraîne la perte de la cystéine 428 donc la liaison avec le fer de l'hème impliquée dans la réaction de catalyse. La délétion des acides aminés 460 à 465 (p.S460_p.P465del) touche deux prolines indispensables à la structure de la protéine. Enfin la délétion de l'exon 10 (p.D407Vfs), entraîne la disparition des acides aminés, Leucine^{480}– Glycine^{484} nécessaires au repliement de la protéine.

A noter que la mutation p.S460_p.P465del a également été trouvée chez 3 formes non classiques (P110-112).

Ainsi, **22 des 107 mutations rares** ont été déclarées **sévères** d'après leur nature et elles ont été identifiées chez **41 des 277 patients** avec une mutation rare (32 formes classiques, 8 non classiques, 1 hétérozygote)**.**

2. Mutations faux-sens

Parmi les 85 mutations faux-sens identifiées au laboratoire, 18 avaient déjà fait l'objet d'études fonctionnelles publiées dans la littérature et disponibles sur le site http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp21.htm.

Pour les 67 autres, nous avons dans un premier temps réalisé une analyse approfondie des données clinico-biologiques des patients et une confrontation à leur génotype, notamment en déterminant la sévérité de l'allèle non porteur de la mutation rare. Ceci nous a permis de déduire la sévérité de certaines mutations faux-sens avant toute étude *in vitro / in silico*.

Les mutations faux-sens seront donc présentées en trois paragraphes :

- les mutations déjà publiées pour lesquelles nous avons confronté les données de la littérature avec le phénotype des patients ;

- les mutations dont la sévérité a été déduite du phénotype ;

- les mutations pour lesquelles seules les études fonctionnelles devaient permettre de trancher.

L'ensemble des 85 mutations est présenté dans la figure 28.

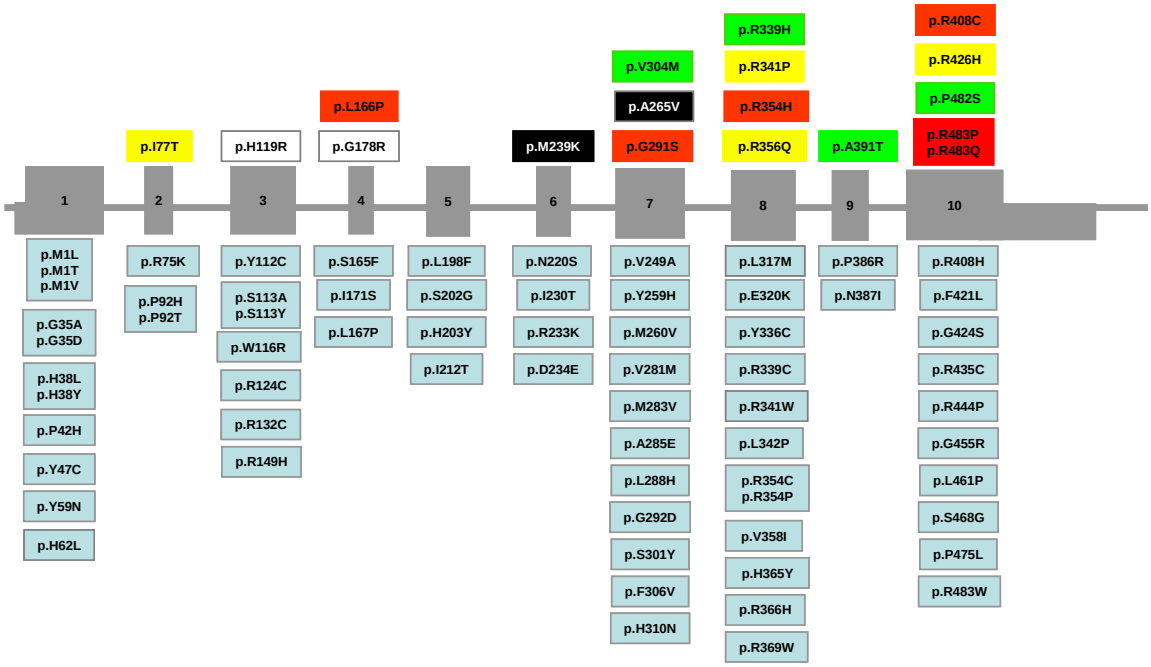


Figure 28 : Mutations faux sens rares identifiées chez nos patients

2.1. Mutations faux-sens dont la sévérité a été publiée dans la littérature

2.1.1. Mutations sévères

Au nombre de 10, elles sont représentées en rouge ou en jaune dans la figure 28, selon si elles sont responsables d'une forme classique avec perte de sel clinique ou d'une forme virilisante pure. Elles sont présentées dans le tableau 16 avec comme informations : les patients dont les données clinico-biologiques sont détaillées dans les tableaux correspondants (tableaux 12, 13, 14 et 15), les génotypes des formes classiques uniquement, les références bibliographiques. La plupart de ces mutations ont été détaillées dans l'article 2.

A part les mutations p.L166P et p.R356Q découvertes seulement chez des formes non classiques avec la mutation modérée p.V281L sur l'autre allèle expliquant leur phénotype, les 8 mutations sévères ont été identifiées chez des patients atteints de forme classique et porteurs d'une mutation sévère sur l'autre allèle.

La mutation p.I77T a été identifiée chez 6 patients atteints de forme classique dont le phénotype est concordant avec le seul cas décrit dans la littérature. La virilisation des organes génitaux externes des filles variait entre Prader 1 et 3. Les enfants non diagnostiqués en période néonatale, ont présenté en général tôt dans l'enfance (moins de 5 ans) une pseudo-puberté précoce suivie d'une puberté centrale avec une petite taille finale, montrant un déficit sévère (SV). Les dosages hormonaux attestent d'une atteinte des voies gluco et minéralocorticoïdes.

La mutation p.G291S a été identifiée chez 5 patients tandis qu'elle avait déjà été décrite chez 4 patients avec une forme SW (Nikoshkov et al., 1998), (Bachega et al., 1998). Tous les garçons ont présenté une perte de sel clinique et la fille une virilisation des organes génitaux externes, le taux de 17-OHP et de rénine étaient élevées.

La mutation p.R341P a été identifiée chez 8 patients attients et déjà décrite chez 4 patients atteints d'une SV. Le dépistage néonatal était positif quand réalisé, les taux de 17-OHP et de rénine étaient très élevés. La virilisation des organes génitaux externes chez les filles variait entre Prader 2 et Prader 4, la pseudo-puberté précoce est apparue tôt dans l'enfance (à moins de 8 ans) avec une avance importante de l'âge osseux.

La mutation p.R354H a été identifié chez 2 cousines, elle avait déjà été décrite chez un patient atteint d'une SW (Nunez et al., 1999). Ces deux filles présentaient une virilisation des organes génitaux externes (Prader 2 et 3), le dépistage néonatal était positif ; la perte de sel clinique a pu être évitée par la mise en route rapide du traitement substitutif et par la présence de la p.I172N ou l'IVS2-13A/C>G sur l'autre allèle.

La mutation p.R408C a été identifiée chez 4 patients et publiée chez 8 autres atteints d'une SW (Billerbeck et al., 2002; Soardi et al., 2008), (Billerbeck et al., 2002) Nous avons tenté de déduire la sévérité du phénotype de la patiente homozygote pour cette nouvelle mutation qui est originaire du Cap Vert et née de parents consanguins (P61). Elle présentait une virilisation modérée des OGE (Prader 1) constatée à l'âge de 1 an lorsqu'elle a été prise en charge en France ; par contre, elle aurait présenté un épisode de perte de sel clinique suite à une gastroentérite. Les autres patients portant cette mutation présentaient un phénotype plus sévère avec perte de sel clinique néonatale chez les garçons et une virilisation importante chez les filles.

La mutation p.R426H a été identifiée chez 6 patients et déjà décrite chez 4 autres (Barbaro et al.2006 et Baumgartner et al.2001). La sévérité de cette mutation peut être déduite du patient qui porte également la mutation IVS2-13A/C>G (P70), les autres ayant la mutation p.I172N sur l'autre allèle déterminant le phénotype de forme virilisante pure. Ce patient a eu un dépistage néonatal positif avec des taux élevés de17-OHP et de rénine.

La mutation p.R483P a été détectée chez 12 patients et déjà décrite chez un seul patient présentant une forme virilisante pure avec la mutation p.I172N sur l'autre allèle. Plusieurs patients de notre série portant une mutation nulle sur l'autre allèle ont présenté une perte de sel clinique ce qui laissait supposer une activité nulle de l'enzyme portant cette mutation.

La mutation p.R483Q a été décrite chez un patient présentant une forme virilisante pure mais portant la mutation p.I172N sur l'autre allèle (Robins et al., 2007). Les études *in vitro* réalisées par cette équipe montrent une activité enzymatique correspondant à une SV (1.1% et 3.8% pour la conversion de 17-OHP et P respectivement). Ces résultats concordent avec le phénotype de nos 3 patients qui ne présentent pas de perte de sel clinique mais ont été diagnostiqués très tôt dans l'enfance pour les garçons, les filles présentant une virilisation des organes génitaux externes.

TABLEAU 16 : Mutations sévères déjà publiées

Exon	Nucléotide	Protéine	Récurrence	Phénotype	Génotype des FC	Référence
2	c.230T>C	p.I77T	6 FC : P 16-21 1 FNC : P24	SV	p.I77T/IVS2-13A/C>G p.I77T/p.R483Pfs p.I77T/Large lésion p.I77T/p.G110Efs p.I77T/p.R356W p.I77T/p.R356W	(Krone et al., 2005a)
4	c.497T>C	p.L166P	1 FNC : P33	NC		(Robins et al., 2007)
7	c.871G>A	p.G291S	5 FC : P31-35	SW	p.G291S/IVS2-13A/C>G p.G291S/Large lésion p.G291S/Large lésion p.G291S/Large lésion p.G291S/Large lésion	(Wedell et al., 1992) (Nikoshkov et al., 1998)
8	c.1022G>C	p.R341P	8 FC : P39-46 2 FNC : P67-68	SV	p.R341P/large lésion p.R341P/large lésion p.R341P/conv intagénique p.R341P/IVS2-13A/C>G p.R341P/p.R356W p.R341P/p.Q318X p.R341P/p.R341P p.R341P/p.R341P	(Robins et al., 2007)
8	c.1061G>A	p.R354H	2 FC : P52-53	SW	p.R354H/ IVS2-13A/C>G p.R354H/p.I172N	(Lobato et al., 1999) (Nunez et al., 1999)
8	c.1067G>A	p.R356Q	3 FNC : P75-77 1 HTZ : P23	NC -		(Lajic et al., 1997b)
10	c.1222C>T	p.R408C	4 FC : P58-61 6 FNC : P80-85	SW	p.R408C/IVS2-13A/C>G+promoteur p.R408C/IVS2-13A/C>G+promoteur p.R408C/p.Q318X p.R408C/p.R408C	(Soardi et al., 2008)
10	c.1277G>A	p.R426H	6 FC : P70-75	SV	p.R426H/IVS2-13A/C>G p.R426H/p.I172N p.R426H/p.I172N p.R426H/p.I172N p.R426H/p.I172N p.R426H/p.I172N	(Baumgartner-Parzer et al., 2001) (Barbaro et al., 2006)
10	c.1448G>C	p.R483P	12 FC : P78, 80-91 6 FNC : P99-104	SW	p.R483P/Large lésion p.R483P/conv ext 5' p.R483P/p.I172N p.R483P/IVS2-13A/C>G p.R483P/IVS2-13A/C>G p.R483P/Large lésion p.R483P/Large lésion p.R483P/IVS2-13A/C>G p.R483P/p.I172N p.R483P/IVS2-13A/C>G p.R483P/p.I172N p.R483P/IVS2-13A/C>G	(Wedell and Luthman, 1993a), (Nikoshkov et al., 1998)
10	c.1448G>A	p.R483Q	3 FC : P69, 92, 93	SV	p.R483Q/IVS2-13A/C>G p.R483Q+p.V281L/IVS2-13A/C>G p.R483Q+p.V281L/p.G424S+p.V281L	(Stikkelbroeck et al., 2003), (Robins et al., 2007)

Certaines de ces mutations sévères ont aussi été identifiées chez des patients atteints de formes non classiques avec une mutation modérée sur l'autre allèle expliquant leur phénotype modéré : les mutations p.I77T, p.L166P, p.R341P, p.R356Q, p.R408C, p.G424S et p.R483P. De même la p.R356Q a été trouvée chez un simple hétérozygote. Ceci souligne l'importance de l'évaluation de la sévérité de ces mutations pour le conseil génétique.

2.1.2. Mutations modérées

Au nombre de 4, elles sont présentées en vert dans la figure 28 et détaillées dans le tableau 17.

L'activité résiduelle obtenue *in vitro* était comprise entre 40 et 70 % (voir références bibliographiques du tableau).

La mutation p.V304M a été détectée chez deux patientes atteintes d'une forme non classique, leur phénotype concorde avec le seul patient décrit dans la littérature (Lajic et al., 2002). Il faut noter qu'une patiente portait sur un allèle la p.V304M associée à la mutation du promoteur, association probablement plus sévère que chacune de ces mutations à l'état isolé. De même, cette mutation modérée a été trouvée chez 2 hétérozygotes.

La mutation p.R339H a été identifiée chez une forme non classique (à l'état hémizygote) et chez un hétérozygote.

La mutation p.A391T, décrite comme modérée par Robins et al.(Robins et al., 2007), a été détectée chez une forme non classique qui porte la mutation sévère p.I172N sur l'autre allèle et chez 2 hétérozygotes.

Enfin, la mutation p.P482S a été identifiée chez 4 patients atteints de formes non classiques et 6 hétérozygotes, tandis que 4 cas étaient décrits dans la littérature (Barbaro et al., 2004). Elle a été publiée comme modérée mais l'analyse des données de nos patients ne permettait pas de trancher formellement entre simple polymorphisme et mutation modérée. A noter qu'un sujet simple hétérozygote (P31) porte sur le même allèle l'association de la p.P482S et de la p.P453S.

TABLEAU 17 : Mutations modérées déjà publiées

Exon	Nucléotide	Protéine	Récurrence	Phénotype	Génotype des FNC	Référence
7	c.910G>A	p.V304M	2 FNC : P59-60 2 HTZ : P17-18	NC	p.V304M/promoteur p.V304M/p.V304M+promoteur	(Lajic et al., 2002)
8	c.1016G>A	p.R339H	1 FNC : P66 1 HTZ : P21	NC	p.R339H/Large lésion	(Helmberg et al., 1992)
9	c.1171G>A	p.A391T	1 FNC : P79 2 HTZ : P25-26	NC	p.A391T/p.I172N	(Robins et al., 2007)
10	c.1444C>T	p.P482S	4 FNC : P95-98 6 HTZ : P28-33	NC	p.P482S/IVS2-13A/C>G+p.P453S p.P482S/p.V281L p.P482S/p.V281L p.P482S+p.P30L/p.V281L	(Balsamo et al., 2000), (Barbaro et al., 2004)

2.1.3 Simples polymorphismes

Présentées en noir dans la figure 28, deux variations de séquence ont été identifiées soit isolées chez des possibles hétérozygotes, soit associées avec une mutation sévère sur le même allèle chez des formes classiques.

La mutation p.M239K, identifiée chez un hétérozygote (P13), fait partie de la triple mutation dans l'exon 6 connue comme abolissant l'activité 21-hydroxylase et trouvée chez environ 1% des patients. Elle a été publiée comme simple polymorphisme (Robins et al.2005).

La mutation p.A265V, publiée en 2008 (Bleicken et al., 2008), a été trouvée chez 3 hétérozygotes (P14-16) ainsi que chez une forme classique mais associée sur le même allèle à la mutation p.Q318X (P29).

2.1.4 Mutations publiées dont la sévérité ne concorde pas avec le phénotype de nos patients

Nous avons rencontré une certaine discordance entre les données clinico-biologiques des patients et les données de la littérature pour 2 mutations (tableau 18):

- La mutation p.H119R, publiée comme modérée (activité 31.6% et 32.5% pour la 17-OHP et P respectivement) et décrite à l'état hémizygote chez une patiente atteinte de forme non classique (Concolino et al., 2009a) que nous avons identifiée chez une fille virilisée (Prader 3) portant sur l'autre allèle la mutation p.I172N, ce qui nous a conduit à la considérer comme plus sévère.

- La mutation p.G178R, publiée par Grischuk et al. 2006, considérée comme très sévère (activité résiduelle de 0.4 et 0 % pour la 17-OHP et la P respectivement), détectée chez 4 patients de notre cohorte ; aucun ne présentait de perte de sel clinique, les deux filles hétérozygotes composites pour la mutation p.G178R et la mutation p.R356W, présentaient plutôt un phénotype de forme non classique. Seule une virilisation très modérée était notée chez une patiente (P1), le diagnostic a été posé plutôt tard dans l'enfance, les taux de 17-OHP n'étaient pas très élevés.

TABLEAU 18 : Mutations publiées dont la sévérité ne concorde pas avec nos patients

Exon	Nucléotide	Protéine	Récurrence	Génotype	Publication
3	c.356A>G	p.H119R	FC : P23	p.H119R/p.I172N	(Concolino et al., 2009a)
4	c.532G>A	p.G178R	F impossibles à classer P1-4	p.G178R/p.R356W p.G178R/p.R356W p.G178R/p.I172N p.G178RIVS2-13A/C>G	(Grischuk et al.,2006)

Ainsi, les données de la littérature nous ont conduit à identifier au sein des **85 mutations faux-sens, 10 mutations sévères, 4 modérées, 2 polymorphismes** tandis que pour **2 une discordance** a été notée entre la littérature et nos patients. Ces mutations ont été identifiées chez **95 patients**.

2.2. Mutations dont la sévérité a été déduite du phénotype des patients

L'analyse approfondie des données clinico-biologiques transmises par les cliniciens nous a permis de déduire le retentissement de 37 mutations faux-sens.

2.2.1 Mutations sévères

Elles ont toutes été identifiées chez des formes classiques avec une mutation sévère sur l'autre allèle (voir tableau 19). Nous avons pu conclure pour certaines qu'elles étaient plutôt responsables d'une forme classique avec perte de sel clinique ou d'une forme virilisante pure.

Certaines mutations ont été trouvées par d'autres équipes mais non étudiées *in vitro* ; nous avons donc comparé le phénotype de nos patients avec ceux de la littérature. Ainsi, la mutation p.R354C trouvée chez 2 formes classiques avait été décrite en 2000 par Krone et al. chez 1 patient atteint de forme classique et porteur de la mutation p.I172N sur l'autre allèle. De même, la mutation p.H365Y trouvée chez un de nos patients, a été décrite dans la littérature chez un patient mais aucune donnée détaillée n'est disponible (Zeng et al., 2004). Enfin, la mutation p.G424S a été identifiée chez 6 patients présentant un phénotype similaire aux 6 cas déjà décrits (Billerbeck et al., 1999) : virilisation des organes génitaux externes variable (Prader type 1 à 3), taux de 17-OHP élevés contrairement aux quelques taux de rénine transmis, la plupart de nos patients étant adultes sans évaluation initiale de la fonction minéralocorticoïde.

La mutation p.H62L, trouvée isolée chez des formes non classiques (voir paragraphe ci-dessous), a été détectée chez certains de nos patients avec une forme plus sévère et dans ce cas systématiquement associée sur le même allèle à une mutation modérée connue, soit la p.P453S soit la p.P30L. Ceci a fait l'objet d'un article publié par notre équipe en 2008 (Menassa et al., 2008) qui est intégré à ce manuscrit (article 1). En fait, le phénotype sévère des patients (virilisation de certaines petites filles, intensité des symptômes) nous avait amené à considérer que ces patients étaient plutôt atteints d'une forme classique que non classique. Nous avons pu rapprocher la sévérité des allèles p.H62L+p.P30L et p.H62L+p.P453S de celle de la conversion génique de l'extrémité 5' du gène ; cette mutation rare, qui englobe la mutation modérée du promoteur du gène et la p.P30L, est responsable soit d'une forme virilisante pure soit d'une forme non classique (Tardy et al., 2001) et elle a été identifiée chez environ 1% de nos patients.

TABLEAU 19 : Mutations sévères d'après le phénotype

Exon	Nucléotide	Protéine	Récurrence	Phénotype	Génotypes des FC
1	c.1A>G	p.M1V	1FC : P1	SW	p.M1V/large lésion
1	c.1A>C	p.M1L	2FC : P2-3	SW/SV	p.M1L/IVS2-13A/C>G p.M1L/p.R483P
1	c.2T>C	p.M1T	1FC : P4	SW	p.M1T/p.M1T
1	c.175T>A	p.Y59N	1FC : P5	SW/SV	p.Y59N/IVS2-13A/C>G
1	c.185A>T	p.H62L + p.P30L p.H62L+p.P453S	10FC : P6-15	SV	p.H62L+p.P30L/p.H62L+p.P30L p.H62L+p.P30L/ p.I172N p.H62L+p.P453S/p.Q318X+p.R356W p.H62L+p.P453S/p.I172N p.H62L+p.P453S/large lesion p.H62L+p.P453S/p.I172N p.H62L+p.P453S/IVS2-13A/C>G p.H62L+p.P453S/IVS2-13A/C>G p.H62L+p.P453S/p.Q318X p.H62L+p.P453S/p.Q318X
3	c.346T>A	p.W116R	1FC : P22	SW/SV	p.W116R/p.Q318X
4	c.500T>C	p.L167P	3FC : P25-27	SW/SV	p.L167P/IVS32-13A/C>G p.L167P/IVS2-13A/C>G p.L167P/p.L167P
7	c.854C>A	p.A285E	1FC : P30	SW/SV	p.A285E/p.I172N
7	c.875G>A	p.G292D	1FC : P36	SW	p.G292D/large lésion
8	c.955G>A	p.E320K	1FC : P38	SV	p.E320K/p.I172N
8	c.1025T>C	p.L342P	1FC : P48	SW/SV	p.L342P/large lésion
8	c.1060C>T	p.R354C	2FC : P49-50 1FNC : P74 1HTZ : P22	SW	p.R354C/conv ext 5' p.R354C/IV2-13A/C>G+p.P453S
8	c.1061G>C	p.R354P	1FC : P51	SW	p.R354P/IVS2-13A/C>G
8	c.1093C>T	p.H365Y	1FC : P54	SW	p.H365Y/p.R483Pfs
9	c.1157C>G	p.P386R	1FC : P55	SW/SV	p.P386R/p.R316X
9	c.1160A>T	p.N387I	2FC : P56-57	SW	p.N387I/large lésion p.N387I/p.R356W
10	c.1263C>A ou G	p.F421L	1FC : P62	SW/SV	p.F421L/p.Q318X
10	c.1270 G>A	p.G424S	7FC : P63-69 2 FNC : P87-88	SV	p.G424S/large lésion p.G424S/p.I172N p.G424S/IVS2-13A/C>G p.G424S/IVS2-13A/C>G p.G424S/p.Q318X p.G424S/IVS2-13A/C>G+p.P453S p.G424S+p.V281L/p.R483Q+p.V281L
10	c.1331G>C	p.R444P	1FC : P76	SW/SV	p.R444P/p.Q318X
10	c.1447C>T	p.R483W	3FC : P77-79	SW/SV	p.R483W/large lésion p.R483W+p.Q318X/p.R483P p.R483W+IVS2-13 A/C>G/IVS2-13A/C>G+p.Q318X

Ainsi, 19 mutations faux-sens peuvent être considérées comme sévères tout comme l'association de la mutation p.H62L à la mutation p.P30L ou p.P453S. La mutation p.R354C a également été identifiée chez un patient atteint de forme non classique ainsi que chez un hétérozygote, la mutation p.G424S chez deux formes non classiques. Tous les patients atteints de formes non classiques ont une mutation modérée sur l'autre allèle expliquant leur phénotype. Ceci souligne l'importance de l'évaluation de la sévérité des mutations pour le conseil génétique.

2.2.2 Mutations modérées

Elles ont toutes été identifiées chez des formes non classiques même en présence d'une mutation sévère sur un deux allèles (voir tableau 20), et pour certaines chez de possibles hétérozygotes.

TABLEAU 20 : Mutations modérées d'après le phénotype

Exon	Nucléotide	Protéine	Récurrence	Génotype des FNC
1	c.104G>A	p.G35D	1FNC : P2	p.G35D/IVS2-13A/C>G
1	c.113A>T	p.H38L	12FNC : P3-14 1 HTZ : P1	p.H38L/Large lésion p.H38L/Large lésion p.H38L/p.I172N p.H38L/p.I172N p.H38L/p.I172N p.H38L/p.V281L p.H38L/IVS2-13A/C>G p.H38L/IVS2-13A/C>G p.H38L/p.V281L p.H38L/p.V281L p.H38L/IVS2-13A/C>G p.H38L/p.V281L
1	c.185A>T	p.H62L	5 FNC : P18-20, 22-23	p.H62L/Large lésion p.H62L/p.I172N p.H62L/p.V281L p.H62L+promoteur/IVS2-13A/C>G p.H62L+promoteur/Large lésion
2	c.274C>A	p.P92T	1 FNC : P25 1 HTZ : P3	p.P92T/Large lésion
2	c.275C>A	p.P92H	1 FNC : P26	p.P92H/large lésion
3	c.335A>G	p.Y112C	1 FNC : P27	p.Y112C/Large lesion
4	c.494C>T	p.S165F	2 FNC : P31-32	p.S165F/conversion intragénique p.S165F/conversion intragénique
4	c.512T>G	p.I171S	2 FNC : P34-35	p.I171S/p.Q318X p.I171S/p.Q318X
5	c.607C>T	p.H203Y	5 FNC : P37-41	p.H203Y/IVS2-13A/C>G p.H203Y/p.V281L p.H203Y/p.V281L p.H203Y/p.R356W p.H203Y/p.V281L
5	c.635T>C	p.I212T	7 FNC : P42-48 3 HTZ : P8-10	p.I212T/Large lésion p.I212T/IVS2-13A/C>G p.I212T/Large lésion p.I212T/Large lésion p.I212T/Triple mutation p.I212T/p.V281L p.I212T/p.V281L
5	c.689T>C	p.I230T	1 FNC : P49	p.I230T/IVS2-13A/C>G
6	c.702T>A	p.D234E	2 FNC : P50-51	p.D234E/IVS2-13A/C>G p.D234E/IVS2-13A/C>G
7	c.847A>G	p.M283V	3 FNC : P55-57	p.M283V/p.V281L p.M283V/p.V281L p.M283V/p.I172N
8	c.949C>A	p.L317M	2 FNC : P61-62	p.L317M/IVS2-13A/C>G p.L317M/p.V281L
8	c.1007A>G	p.Y336C	2 FNC : P63-64	p.Y336C/Large lésion p.Y336C/Large lésion
10	c.1223G>A	p.R408H	1 FNC : P86 1HTZ : P11	p.R408H/Large lésion
10	c.1303C>T	p.R435C	2 FNC : P89-90	p.R435C/p.Q318X p.R435C/IVS2-13A/C>G
10	c.1424C>T	p.P475L	1 FNC : P94	p.P475L/IVS2-13A/C>G

Concernant la mutation p.H62L, nous l'avons trouvée responsable d'une forme non classique lorsqu'elle est isolée (P18-20) ou lorsqu'elle est associée à la mutation modérée affectant le promoteur (3 substitutions sur les 4 habituelles) (P22-23) ; l'association de la mutation p.H62L avec celle du promoteur semble donc moins sévère que les associations p.H62L + p.P30L ou p.P453S décrites ci-dessus, ceci peut être comparé avec la conversion de l'extrémité 5' qui, comme déjà expliqué, donne un phénotype de sévérité variable selon les patients.

Ainsi, **sur les 85 mutations faux-sens**, nous avons pu conclure grâce à une description phénotypique suffisante des patients et à la connaissance de leur génotype, que **19 d'entre elles étaient sévères et 18 modérées**. De même, l'association sur le même allèle de la mutation p.H62L avec la p.P30L ou la p.P453S doit être également considérée comme un allèle sévère. Ces mutations ont été détectées chez **98 patients**.

Au total, avec les **18 mutations faux-sens publiées** décrites précédemment, nous avons pu conclure avant toute étude *in vitro*/*in silico* à la sévérité de **55 des 85 mutations faux-sens** ; une prise en charge thérapeutique et un conseil génétique corrects ont ainsi été proposés à **193 des 239 patients**.

2.3 Mutations impossibles à classer

Au terme de l'analyse fine des données de la littérature et du phénotype des patients, il restait 32 mutations dont la sévérité était impossible à déterminer, les raisons étant les suivantes :

- [1]détection chez des formes non classiques avec une mutation modérée sur l'autre allèle,
- [2]détection chez de possibles hétérozygotes,
- [3]phénotype des patients différent de la littérature et absence d'études *in vitro*,
- [4]phénotype des patients en faveur d'une forme intermédiaire,
- [5]association de la mutation sur le même allèle à une mutation modérée ou sévère,
- [6]nouvelle mutation sur l'autre allèle.

De même, 2 nouvelles mutations faux-sens considérées comme modérées, la p.R149H et p.I230T, ont été trouvées associées à une mutation modérée avec un phénotype plus sévère.

Ces mutations sont présentées dans le tableau 21 en précisant à quel groupe cité ci-dessus elles appartiennent (1 à 6).

TABLEAU 21 : Mutations impossibles à classer d'après le phénotype

Exon	Nucléotide	Protéine	Récurrence	Génotype
1	c.104G>C	p.G35A [1]	1 FNC : P1	p.G35A/p.V281L
1	c.112C>T	p.H38Y [1]	1 FNC : P15	p.H38Y/p.V281L
1	c.125C>A	p.P42H [5]	1 FNC : P16	p.P42H+ p.V281L /p.V281L
1	c.140A>G	p.Y47C [1]	1 FNC : P17	p.Y47C/promoteur 2 sur 4
2	c.224G>A	p.R75K [2]	1 HTZ : P2	p.R75K/-
3	c.337T>G	p.S113A [1]	2 FNC : P28-29	p.S113A/p.V281L p.S113A/p.V281L
3	c.338C>A	p.S113Y [1]	1 FNC : P30	p.S113Y/p.V281L
3	c.370C>T	p.R124C [2]	1 HTZ : P4	p.R124C/-
3	c.394C>T	p.R132C [5]	1 FC : P24	p.R132C+IVS2-13A/C>G/conv ext 5'
4	c.446G>A	p.R149H+p.P453S [4,5]	1 F interM : P11	p.R149H+p.P453S/Large conversion
5	c.594A>T	p.L198F [1]	1 FNC : P36 1 HTZ : P5	p.L198F/p.V281L
5	c.604A>G	p.S202G [2]	1 HTZ : P6-7	p.S202G / -
6	c.659A>G	p.N220S [6]	1 HTZ : P11	p.N220S et p.R408H
5	c.689T>C	p.I230T+p.V281L [4,5]	1 F inter : P5	p.I230T+p.V281L/Large lésion
6	c.698G>A	p.R233K [2]	1 HTZ : P12	p.R233K/-
7	c.746T>C	p.V249A [1]	1 FNC : P52	p.V249A/p.V281L
7	c.775T>C	p.Y259H [5]	1 FC : P28	p.Y259H+IVS2-13A/C>G/p.R356W
7	c.778A>G	p.M260V [1]	1 FNC : P53	p.M260V/p.V281L
7	c.841G>A	p.V281M [1]	1 FNC : P54	p.V281M/p.V281L
7	c.863T>A	p.L288H [1]	1 FNC : P58	p.L288H/p.V281L
7	c.902C>A	p.S301Y [3,4]	2 F interM : P6-7	p.S301Y/ IVS2-13A/C>G p.S301Y/p.G110Vfs
7	c.916T>G	p.F306V [5]	1 FC : P37	p.F306V+p.V281L/IVS2-13A/C>G
7	c.928C>A	p.H310N [2]	2 HTZ : P19-20	p.H310N/-
8	c.1015C>T	p.R339C [1]	1 FNC : P65	p.R339C/p.V281L
8	c.1021C>T	p.R341W [3,4]	1 FC : P47 5 FNC : P69-73	p.R341W/large lésion p.R341W/IVS2-13A/C>G p.R341W/p.V281L p.R341W/p.I172N p.R341W/large lésion p.R341W/L307Ffs
8	c.1072G>A	p.V358I [1]	1 FNC : P78	p.V358I/p.V281L
8	c.1097G>A	p.R366H [2]	1 HTZ : P24	p.R366H/-
8	c.1105C>T	p.R369W [4]	2 F interM : P9-10	p.R369W/IVS2-13A/C>G p.R369W/p.Q318X
10	c.1363G>A	p.G455R [1]	1 FNC : P91 1 HTZ : P27	p.G455R/p.V281L
10	c.1382T>C	p.L461P [1]	1 FNC : P92	p.L461P/p.V281L
10	c.1402A>G	p.S468G [1]	1 FNC : P93	p.S468G/p.V281L

Cinq mutations faux-sens nous ont posé un problème dans l'évaluation de leur sévérité car responsables soit d'un phénotype qualifié d'intermédiaire entre forme non classique et forme virilisante pure, soit d'un phénotype variable selon les patients.

Il s'agit des 2 mutations faux-sens associées sur le même allèle à une mutation modérée :

- La mutation p.R149H trouvée uniquement associée à la mutation p.P453S et ce à l'état hémizygote chez un patient actuellement adulte dont le bilan hormonal n'a pu être malheureusement récupéré ; le diagnostic a été posé à 9 ans, l'évolution a été favorable sous de fortes doses d'hydrocortisone et il est impossible de trancher entre forme non classique et virilisante pure.

- la mutation p.I230T associée sur le même allèle à la mutation p.V281L qui semble donner une forme plus sévère que lorsqu'elle est isolée et alors responsable d'une forme non classique (tableau 20). La seule petite fille porteuse de l'association p.I230T + p.V281L et ce à l'état hémizygote, a été dépistée à la naissance mais ne présentait pas de virilisation des organes génitaux externes. Une gastroentérite aigue a conduit à son décès très tôt dans l'enfance mais sans que la responsabilité du seul déficit en 21-hydroxylase ne soit prouvée.

De même, 3 autres mutations isolées portent à discussion :

- La mutation p.S301Y, décrite chez des patients atteints de forme non classique (Stikkelbroeck et al., 2003). Nous l'avons trouvée chez deux patients qui semblent avoir une forme plus sévère : le patient P6 (tableau 14), hétérozygote composite pour la mutation p.S301Y et la mutation IVS2-13A/C>G, présentait une forme intermédiaire avec une rénine élevée (ARP = 460 ng/100ml/h) attestant un déficit en minéralocorticoïdes. Le patient P7 (tableau 14), portant la mutation sévère p.G110Vfs sur son autre allèle, a été dépisté à la naissance avec un bilan hormonal évoquant une forme classique et l'équilibre est correct sous hydrocortisone et fludrocortisone.

- La mutation p.R341W, décrite dans la littérature comme modérée, a été identifiée chez 6 filles dont 5 atteintes de forme non classique tandis que la dernière présentait une virilisation importante des OGE évaluée Prader 4 (P47) ; cette petite fille n'a été diagnostiquée qu'à l'âge de 5 ans mais le bilan hormonal attestait d'un déficit en 21-hydroxylase sévère, avec notamment atteinte de la voie minéralocorticoïde, ce qui nous a conduit à remettre en question sa sévérité.

- la mutation p.R369W détectée chez deux filles (P9-10, tableau 14) portant sur l'autre allèle une mutation nulle. L'une dépistée à la naissance, non virilisée, avait un taux élevé de rénine attestant d'un déficit en minéralocorticoïdes ; la seconde, n'a été diagnostiquée qu'à l'âge de 9 ans face à une puberté centrale, avec des taux de 17-OHP sous ACTH intermédiaires entre une forme non classique et une forme virilisante pure.

Ainsi, pour **29 des 85 mutations faux-sens**, ainsi que pour les deux allèles p.R149H+p.P453S et p.I230T+p.V281L, seules les études *in vitro* et *in silico* devaient permettre de déterminer leur sévérité ; ceci concerne **42 des 239 patients**

III. Etude *in vitro* de 14 mutations rares

Nous avons étudié les 14 mutations suivantes (figure 29) ainsi que l'association de 2 d'entre elles avec une mutation modérée connue, association identifiée chez des patients. Il s'agit des mutations p.H62L trouvée isolée ou associée à la p.P453S et p.I230T isolée ou associée à la p.V281L. Comme expliqué dans le chapitre précédent II, le phénotype des patients semblait plus sévère en cas d'association et nous voulions le confirmer *in vitro*. Le nombre des patients chez lesquels nous avons trouvé ces mutations est indiqué entre parenthèses.

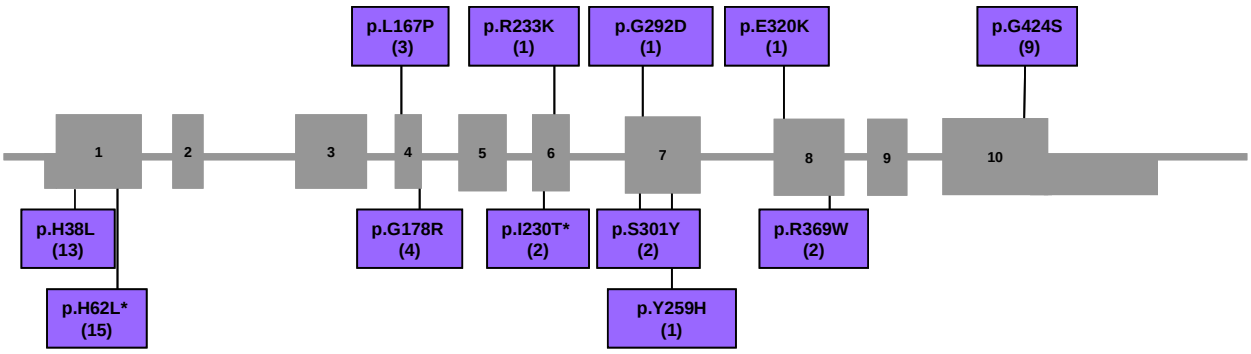


FIGURE 29 : Mutations faux-sens testées in vitro

** : p.H62L et p.I230T testées soit isolées ou associées sur le même allèle à une mutation modérée connue (p.P453S ou p.V281L)*

1. Analyse comparative des mutants par rapport à la protéine normale

1.1. Validation des études *in vitro*

La technique de mutagenèse dirigée, initialement développée au laboratoire pour l'étude du gène *CYP11B1* codant pour l'enzyme 11β-hydroxylase, a été mise au point pour l'étude des nouvelles mutations du gène *CYP21A2*.

A/ Validation de la technique :

Après avoir mis au point la construction des plasmides mutés et la culture des cellules COS-1, il a fallu optimiser la mise au point de la transfection par la lipofectamine, utiliser la bonne méthode d'extraction des stéroïdes avec des solvants appropriés et enfin maîtriser les logiciels de quantification et de calcul de l'activité enzymatique.

Une chromatographie sur couche mince des substrats de la 21-hydroxylase avec leurs produits froids a été réalisée dans un premier temps afin de vérifier une séparation correcte avec la phase mobile utilisée dans la littérature (Krone et al., 2005a).On a pu confirmer la bonne séparation de la Progestérone (P) et de la Désoxycorticostérone (DOC) ainsi que de la 17-hydroxyprogestérone (17-OHP) avec le 11-désoxycortisol (composé S) (figure 30). La 17-OHP et la DOC ont des profils de migration semblables mais ne sont pas sur la même piste.

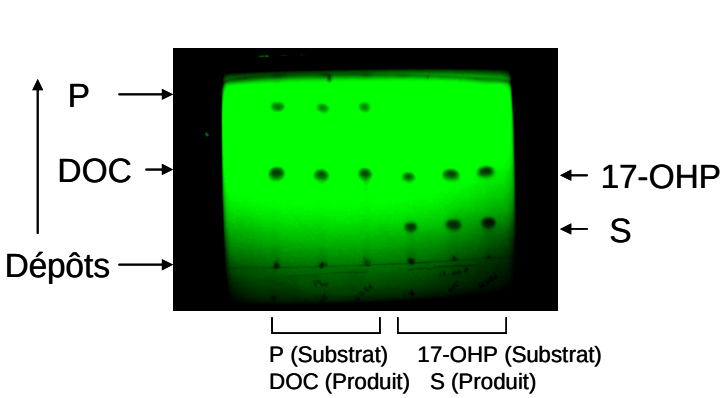


FIGURE 30 : Exemple de l'électrophorèse des stéroïdes détéctés (froid) sous UV

Concernant l'extraction des stéroïdes radioactifs, nous avons d'abord choisi la méthode publiée par Lajic et al.,en 1997 (Lajic et al., 1997b) basée sur l'utilisation du dichlorométhane comme solvant organique. La phase supérieure était la phase aqueuse et les stéroïdes étaient contenus dans la phase inférieure ; il s'est avéré difficile d'aspirer la phase supérieure sans risque de perdre les stéroïdes. Nous avons donc utilisé un mélange acétate d'éthyle/isooctane 1/1 avec cette fois-ci obtention d'une phase inférieure aqueuse ; une fois congelée, nous avons pu récupérer correctement la phase supérieure renfermant les stéroïdes.

B/ Validation par l'introduction de contrôles

Nous avons utilisé des contrôles avec une activité 21-hydroxylase connue, étape préliminaire indispensable pour une interprétation correcte et rigoureuse des résultats obtenus avec les nouvelles mutations faux-sens. En plus des témoins habituels, plasmide vide sans ADNc et plasmide sauvage renfermant l'ADNc normal codant pour une protéine sauvage, trois vecteurs contrôles contenant des mutations connues et fréquentes ont été utilisés : la mutation p.Q318X qui abolit l'activité 21-hydroxylase et est associée à la forme SW, la mutation p.I172N avec une activité résiduelle aux alentours de 3% (Tusie-Luna et al., 1990) et associée à la forme SV, la mutation p.V281L avec une activité résiduelle de 50% environ (Tusie-Luna et al., 1990).

Nous avons ainsi validé le système en obtenant pour les 3 contrôles des résultats concordants avec ceux de la littérature. Nous avons donc pu démarrer l'étude des nouveaux mutants (figure 29). Dans chaque série, nous avons systématiquement inclus comme contrôles les mutations p.I172N et p.V281L, la mutation p.Q318X n'étant pas utile puisque le plasmide vide servait de contrôle d'absence d'activité.

1.2. Résultats

L'analyse des résultats obtenus pour chaque mutation et pour les différents contrôles est dans le tableau 22. Pour chaque mutation sont indiqués :

- l'activité relative c'est-à-dire rapportée au plasmide sauvage (WT), pour la 17-OHP et la P.

- le nombre de répétitions de l'expérience *(n)* : Pour que les résultats soient significatifs, chaque expérience doit être répétée au moins deux fois.

TABLEAU 22 : Activités relatives des nouvelles mutations et des contrôles

Mutations	**17-OHP**		**Progestérone**	
	Activité relative (%)	**Nombre, *n***	**Activité relative (%)**	**Nombre, *n***
WT	100.0	4	100.0	4
p.G292D	0.5 (0.02)	2	0.7 (0.4)	2
p.L167P*	0.7	1	0.4	1
p.G424S	1.6 (0.4)	3	2 (0.6)	3
p.E320K	4.6 (1.8)	2	4.5 (2.6)	2
p.I172N	4.3 (1.7)	4	4.4 (1.8)	4
p.I230T+p.V281L	9.4 (6.6)	2	8.5 (5.3)	2
p.H62L+p.P453S*	11.1	1	31.5	1
p.R233K	15.04 (6.6)	4	8.1 (2.6)	4
p.H38L	18.5 (12.05)	3	17.9 (7.7)	3
p.P30L	34.1 (18.5)	2	38.8 (22.2)	2
p.G178R	41.98 (13.1)	3	43.6 (11.36)	3
p.R369W	45.8 (1.8)	2	48.5 (17.2)	2
p.S301Y	56.9 (13.6)	4	57.2 (10.4)	4
p.V281L	65.6 (10.9)	4	63.4 (8.7)	4
p.H62L*	29.2	1	66.5	1
p.I230T	63.1 (22.3)	2	70.6 (17)	2
p.P453S*	81.5	1	63	1
p.Y259H	90.5	1	97.6 (1.7)	2

* : L'activité des mutants p.H62L, p.H62L+p.P453S, p.L167P et p.P453S a été calculée pour une incubation de deux heures avec les mêmes résultats. Les valeurs entre parenthèses correspondent à 1 SD.

1.2.1 Mutations responsables d'une forme classique

A) Mutations abolissant de façon quasi-totale l'activité 21-hydroxylase

Deux mutations ont été trouvées avec une activité résiduelle inférieure à 1 %, tant pour la 17-OHP que pour la P, il s'agit des mutations p.L167P et p.G292D identifiées chez des patients avec une forme classique. Concernant les 3 patients avec la p.L167P (P25-27), la perte de sel clinique a été évitée par une prise en charge néonatale immédiate ; la patiente avec la p.G292D (P36) a présenté une décompensation surrénalienne malgré une virilisation importante des organes génitaux externes.

B) Mutations laissant persister une faible activité enzymatique

Deux mutations, p.E320K et p.G424S, laissent persister une faible activité enzymatique, proche de celle obtenue avec la p.I172N. Elles ont été identifiées chez des patients atteints de forme classique de type virilisante pure ; concernant la p.E320K, elle a été identifiée chez un patient (P38, tableau 12) avec la mutation p.I172N sur l'autre allèle, ce qui ne permettait donc pas d'exclure que la p.E320K ne soit pas plus sévère. Nous ne pouvions donc pas trancher à partir du seul phénotype du patient, entre mutation associée à la forme SW ou SV.

La récurrence de la p.G424S, identifiée notamment chez 7 patients atteints d'une forme classique (P63-69), nous a permis de déduire de leur phénotype sa sévérité et de la confirmer par les études *in vitro*. A noter qu'elle avait déjà été décrite dans la littérature chez 6 patients (Billerbeck et al., 1999). Les filles de notre cohorte présentaient une virilisation variant entre Prader types 1 et 3 ; malgré la présence chez certains patients d'une mutation nulle sur l'autre allèle, il n'y a eu jamais de perte de sel clinique.

1.2.2 Mutations responsables d'une forme intermédiaire

Nous avons détecté 6 mutants avec une activité intermédiaire entre les contrôles p.I172N et p.V281L. Trois ont été trouvés de sévérité intermédiaire entre la p.I172N et la p.P30L : il s'agit de la p.R233K et des deux associations p.I230T+p.V281L et p.H62L+p.P453S. Les trois autres mutations p.G178R, p.R369W et p.S301Y, semblaient un peu moins sévères, entre la p.P30L et la p.V281L.

Le phénotype des patients avec une des mutations p.G178R, p.R369W, p.S301Y ou p.I230T+p.V281L, nous avait amenés à les classer dans un groupe à part ; la mutation p.R233K n'a été identifiée que chez un hétérozygote donc il nous était impossible de déduire sa sévérité du phénotype. Seules les études *in vitro* devaient nous aider pour le conseil génétique à proposer à

cet homme et sa compagne atteinte de forme classique. Enfin, l'association p.H62L+p.P453S semblait responsable d'une forme plutôt sévère d'après le phénotype des 8 patients (P8-15).

Concernant la mutation p.G178R, elle a été décrite par Grishuk et al. (Grischuk et al., 2006) comme abolissant l'activité enzymatique ; le phénotype de nos patients ainsi que les études *in vitro* ne sont pas en accord avec ces résultats. La patiente décrite par Grishuk et al. a été diagnostiquée à l'âge de 6 ans. Une petite virilisation des organes génitaux externes a été notée, ne demandant pas de chirurgie correctrice. Elle était hétérozygote composite pour la mutation p.I172N et p.G178R. La discordance entre les deux résultats pourrait provenir d'une erreur dans la construction du plasmide contenant la p.G178R.

Enfin, les mutations p.H62L et p.I230T qui sont des mutations modérées (voir paragraphe suivant), ont un retentissement plus sévère lorsqu'elles sont associées à une mutation modérée, du fait de l'action synergistique des deux mutations.

Ainsi, ce groupe de mutations avec une activité intermédiaire pose le problème du conseil génétique à apporter aux patients qui les portent ; faut-il considérer qu'une activité résiduelle de 10 à 15 % est potentiellement à risque de virilisation d'un fœtus féminin ?Le degré de virilisation des filles portant l'une des mutations de ce groupe de formes intermédiaires a été comparé avec celui des deux sous-groupes de notre cohorte : les filles atteintes de forme non classique qui ne sont pas virilisées exceptés 4 % qui ont une hypertrophie clitoridienne régressant les premiers mois de vie ainsi que les filles atteintes de forme virilisante pure qui pour 6 % d'entre elles ne sont pas virilisées.

1.2.3 Mutations responsables d'une forme non classique

Trois mutations ont été trouvées avec une activité modérée : p.H38L, p.H62L et p.I230T.

Les mutations p.H62L et p.I230T laissaient persister une activité proche de celle obtenue pour les p.V281L et p.P453S.

La mutation p.H62L a été la première mutation étudiée *in vitro* dans notre laboratoire. Elle a fait l'objet du premier article publié : « p.H62L, a Rare Mutation of the CYP21 Gene Identified in Two Forms of 21-hydroxylase Deficiency » (Menassa et al., 2008) (article 1). Nous avons choisi de l'étudier en premier car elle était récurrente (15 patients) et identifiée soit isolée avec un phénotype modéré soit associée sur le même allèle avec une autre mutation modérée, dans ce cas un phénotype sévère a été noté avec une virilisation des organes génitaux externes (P7,9,10,11,15, tableau 12).

La p.I230T est décrite dans le deuxième article soumis en 2009 : « Phenotype-Genotype correlations of 13 rare *CYP21A2* mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier » (Tardy et al.,2009). La mutation p.I230T a été trouvée à deux reprises soit isolée chez une patiente présentant une forme non classique, hirsutisme et dysménorrhée à 17 ans, soit associée sur le même allèle à la mutation p.V281L. Dans ce dernier cas, il était difficile de trancher la sévérité du seul phénotype ; la petite fille était atteinte d'une forme intermédiaire entre NC et SV (pas d'ambiguïté sexuelle mais décompensation surrénalienne dans un contexte de stress). Une gastroentérite aigue survenant tôt dans l'enfance a provoqué le décès la première année de vie.

La p.H38L laisse persister une activité proche de celle de la p.P30L et considérée comme modérée car les 12 patientes chez lesquelles elle a été identifiée étaient atteintes de la forme NC en dépit de la présence pour 8 d'entre elles d'une mutation sévère sur l'autre allèle. Elle n'a jamais été identifiée chez des formes classiques.

1.2.4 Polymorhisme p.Y259H

Les études *in vitro* réalisées pour la p.Y259H montrent que cette nouvelle variation de séquence est plutôt un simple polymorphisme avec une activité proche de celle obtenue pour le plasmide normal (figure 31). Elle a été identifiée chez une patiente hétérozygote composite pour deux mutations sévères, p.R356W et l'association des deux mutations, IVS2-13A/C>G et p.Y259H. Elle était atteinte de la forme classique avec perte de sel clinique (P28, tableau 12). Il était donc impossible de déterminer la sévérité de la p.Y259H du phénotype (figure 31).

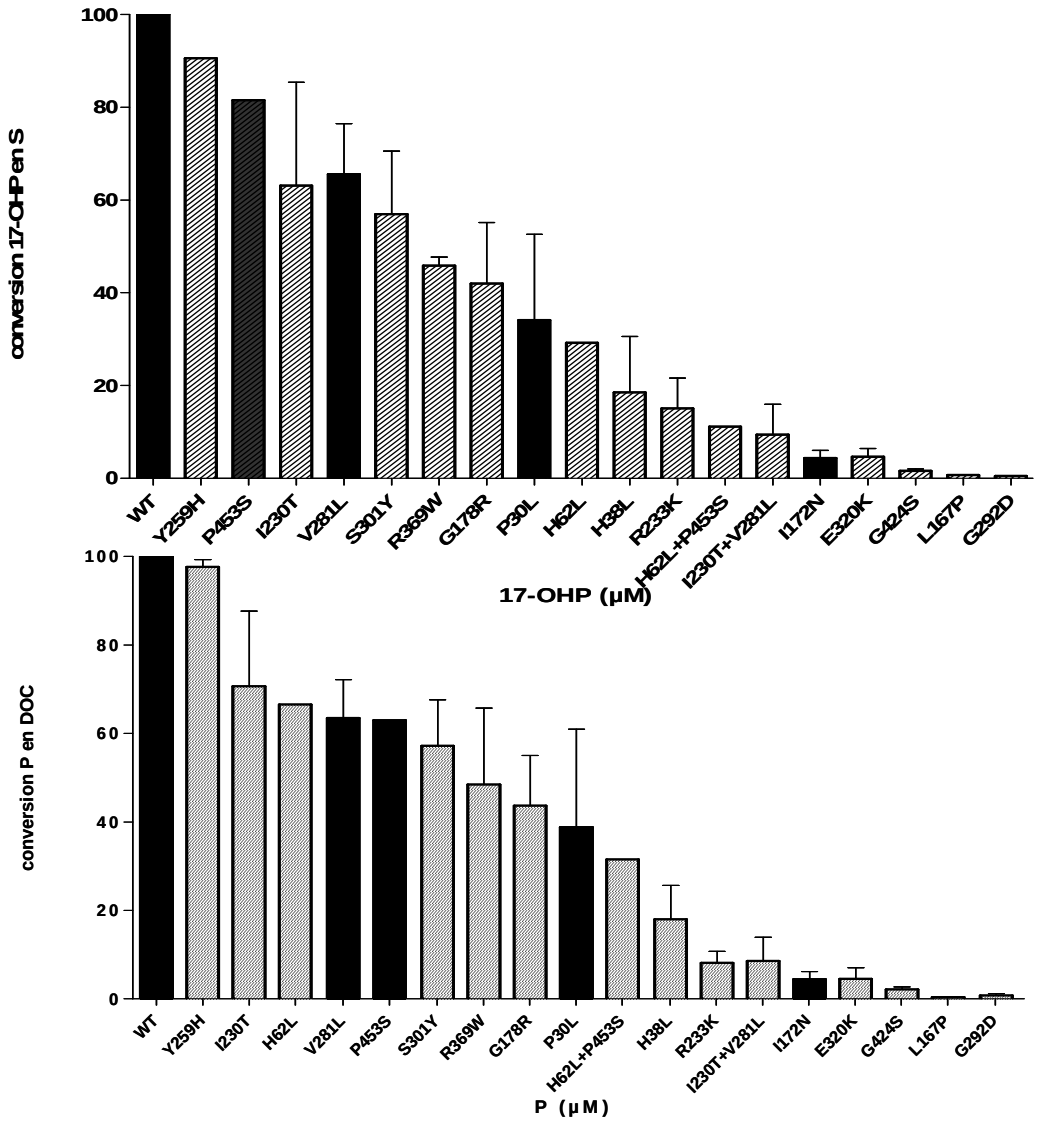


FIGURE 31 : Activités relatives des différents mutants après 1H30 d'incubation du substrat, le WT étant défini à 100%.

2. Etude cinétique avec résultats des constantes de Michaelis-Menten Km et Vmax

2.1. Mise au point

Des études cinétiques ont été réalisées en complément des analyses quantitatives, notamment afin de mieux comprendre la répercussion des nouvelles mutations sur l'activité enzymatique, avec analyse de deux paramètres Km et Vmax. Par définition, le Km est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse mesurée est égale à la moitié de la vitesse maximale V_{max} ; l'unité de Km est **M**. Le calcul du Km permet d'évaluer l'affinité de l'enzyme pour le substrat. De même, la Vmax est la vitesse maximale de la réaction, elle est exprimée en pmol/mg/min. Une mutation située dans n'importe quel domaine de l'enzyme diminue le Vmax.

Plusieurs difficultés ont été rencontrées dans la mise au point de cette technique:

1- La quantité variable de cellules distribuées dans les différents puits qui est sous l'influence de deux facteurs différents:

i) Le comptage des cellules réalisé sur une cellule de Malassez, soit sur un compteur automatique. Ce comptage étant variable d'une expérience à une autre, surtout avec la cellule de Malassez, nous avons dû réaliser les expériences en triplet (et non en trois transfections indépendantes dans le temps) afin de comparer correctement les valeurs des constantes de cinétique et s'astreindre du nombre variable de cellules présentes.

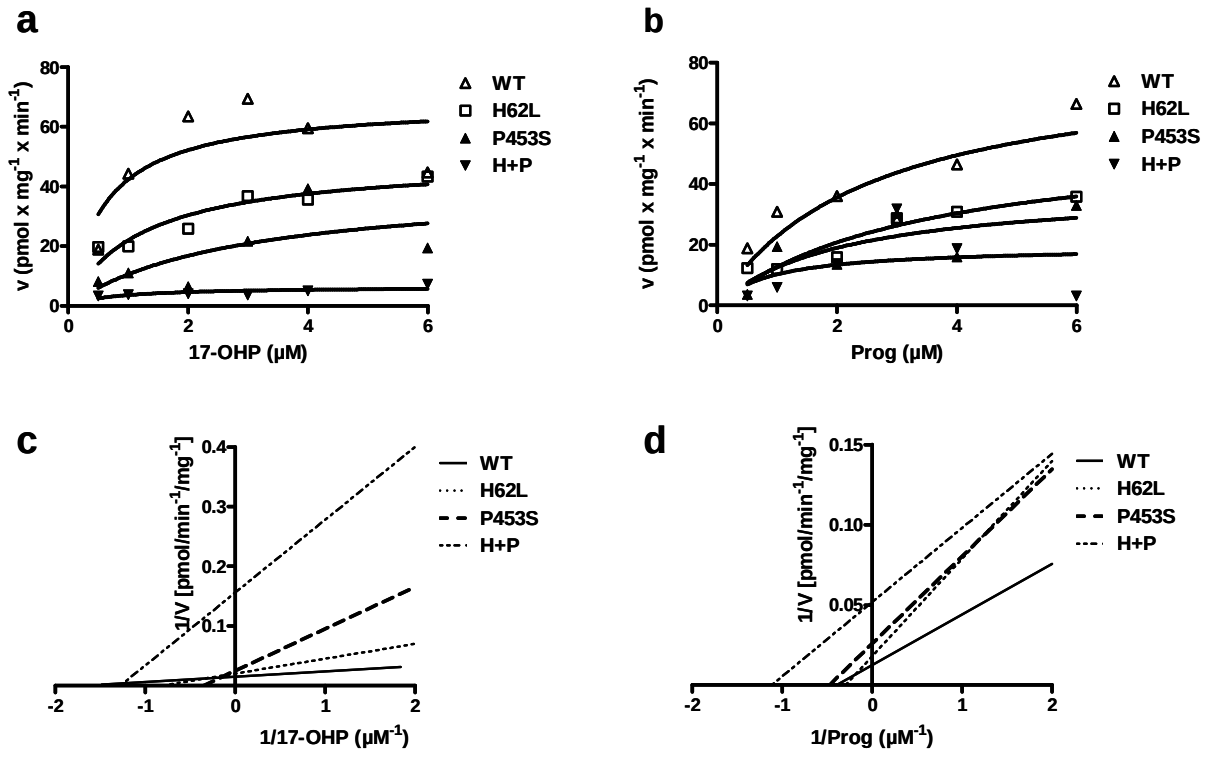
ii) Une homogénéisation régulière du tube contenant la suspension de cellules à distribuer qui est indispensable

2- La nécessité de quantifier correctement les protéines totales, reflets de l'activité cellulaire et pouvant varier d'un puits à l'autre donc influencer l'activité enzymatique ; l'efficacité de l'extraction des protéines totales dépend de l'utilisation de détergent comme le NP40 ou le Triton qui permettent la solubilisation des cellules.

Ainsi l'optimisation des études cinétiques a nécessité une mise au point longue de ces différents paramètres avant d'étudier les mutants.

2.2. Calcul des constantes cinétiques des différents mutants

Nous avons calculé les constantes de cinétique de 3 mutations (p.H62L isolée et associée à la p.P453S, p.G178R et p.G424S). Ainsi après avoir calculé les vélocités (V) pour chaque concentration de substrat incubé, nous avons intégré les résultats dans le logiciel « Graph pad Prism » pour obtenir ainsi les courbes de Michaelis-Menten (figure 32, a et b), les représentations de Lineweaver et Burke (figures 32, c et d) et les valeurs des constantes de cinétique (32, e).



e

	17-OHProgestérone		Progestérone	
	Km (µM)	Vmax (pmol.mg^{-1}.min^{-1})	Km (µM)	Vmax (pmol.mg^{-1}.min^{-1})
WT	0.6	68.1	2.6	81.2
P453S	2.9	40.9	2.1	39.07
H62L	1.2	49.2	3.4	56.5
H62L+P453S	0.8	6.4	0.9	19.4

FIGURE 32 : Etude cinétique des deux nouveaux mutants, p.H62L et p.H62L+p.P453S, comparée à celle du WT et de la p.P453S isolée

1. p.H62L

D'après les études cinétiques, la p.H62L entraîne une diminution de la Vmax sans modification notable du Km (figure 32). Cette mutation ne doit donc pas affecter la liaison au substrat.

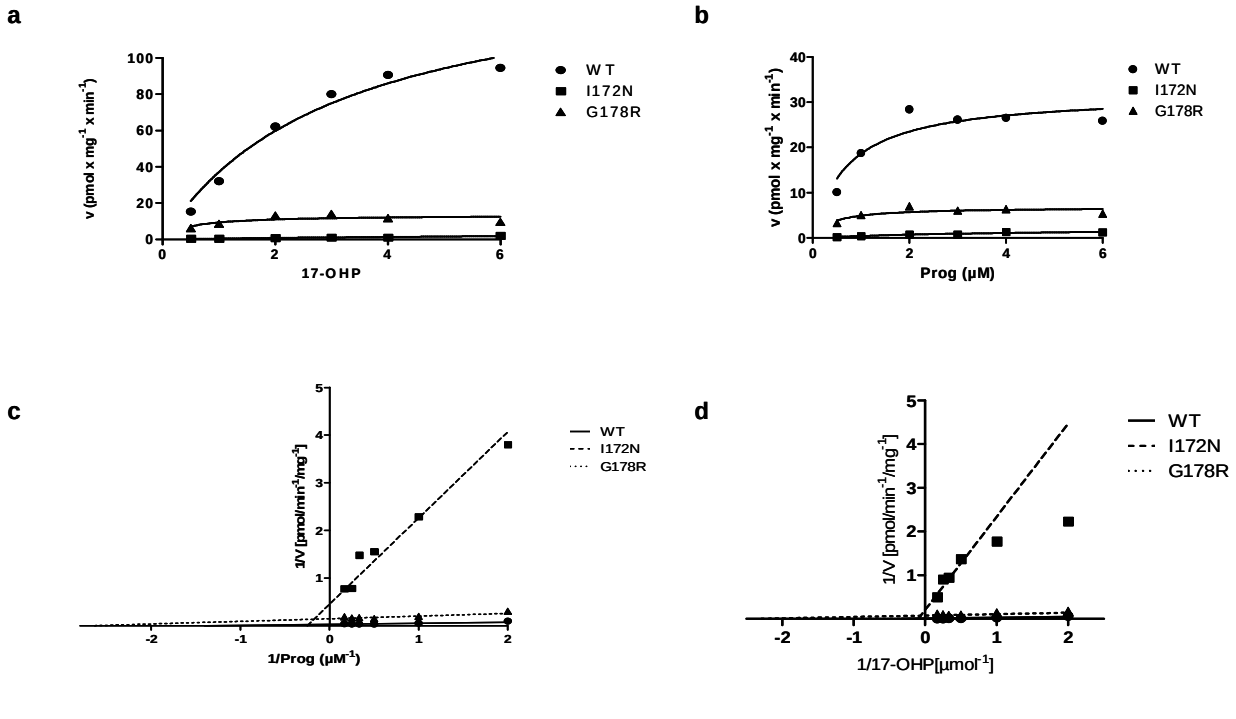
2. Association p.H62L+p.P453S

Dans ce cas, on constate une diminution plus importante de la Vmax de l'enzyme ce qui montre l'effet cumulatif des deux mutations associées sur un même allèle. Ceci est concordant

avec le phénotype plus sévère des patients portant l'association des deux mutations par rapport aux patients avec l'une des mutations isolée.

3. p.G178R

Les études cinétiques concordent bien avec les phénotypes des patients et les analyses quantitatives, la mutation p.G178R paraît une mutation intermédiaire, moins sévère que la mutation p.I172N. Les valeurs de Km ne sont pas différentes de celles du WT, ce qui montre que la p.G178R ne touche pas la liaison au substrat (figure 33).



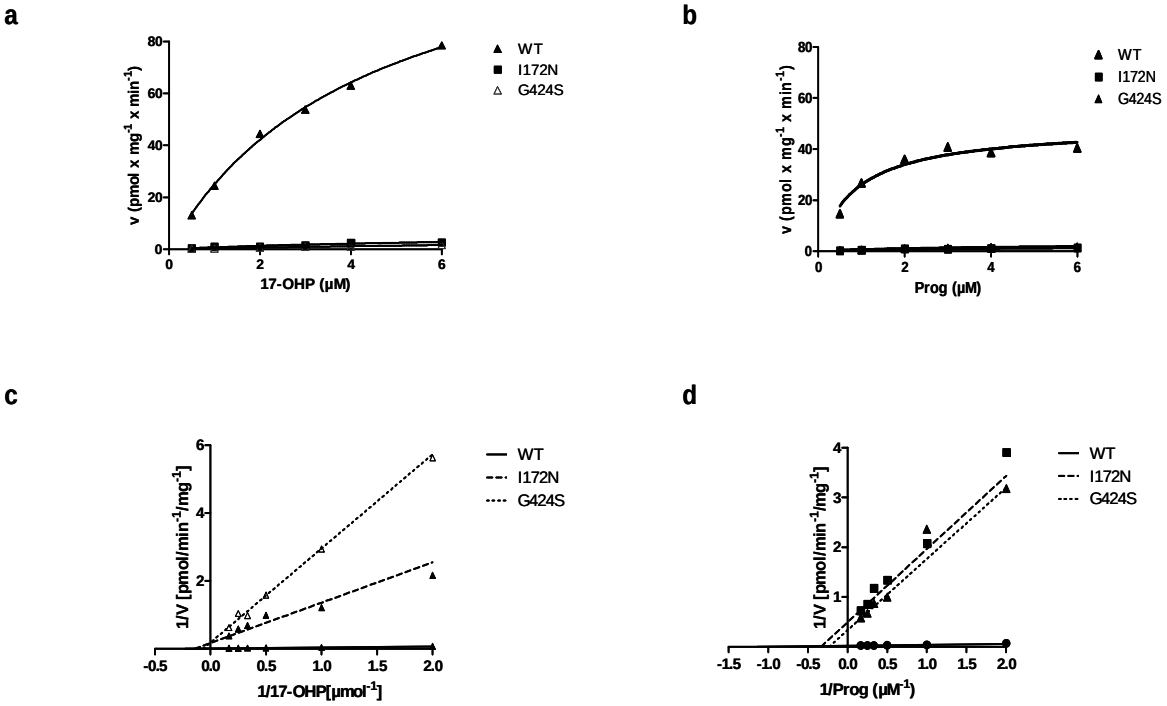
e

	17-OHProgestérone		Progestérone	
	Km (µM)	Vmax (pmol.mg^{-1}.min^{-1})	Km (µM)	Vmax (pmol.mg^{-1}.min^{-1})
WT	3.1 ± 0.6	153.2 ± 15.1	0.7 ± 0.3	31.9 ± 3.1
I172N	10.7 ± 7.2	5 ± 2.5	4 ± 2.8	2.2± 0.8
G178R	0.4 ± 0.2	13.4 ± 1.3	0.4 ± 0.2	6.8± 0.7

FIGURE 33 : Etude cinétique de la p.G178R comparée au WT et à la p.I172N

4. p.G424S

La diminution très importante de la Vmax associée à une augmentation du Km attestent que le résidu G424 est situé dans le site actif du cytochrome et joue un rôle très important (figure 34).



e

	17-OHProgestérone		Progestérone	
	Km (µM)	Vmax (pmol.mg^{-1}.min^{-1})	Km (µM)	Vmax (pmol.mg^{-1}.min^{-1})
WT	4.4± 0.4	135.1 ± 7.6	0.9± 0.2	48.9 ± 3.4
I172N	7.2± 5.2	6.05 ± 2.8	3 ± 1.2	2.05 ± 0.4
G424S	15.97 ± 11.9	5.7 ± 3.4	4.4 ± 1.1	3.04 ± 0.4

FIGURE 34 : Etude cinétique de la p.G424S comparée au WT et à la p.I172N

3. Analyse par Western Blot :

Les protéines obtenues à partir des différents mutants, du plasmide sauvage et du plasmide vide, ont été analysées par Western Blot. Les résultats de l'électrophorèse en gel polyacrylamide-10% de SDS sont présentés dans la figure 35. On note une quantité comparable des différentes protéines obtenues avec la limite d'une estimation semi-quantitative : Plusieurs étapes limitent cette technique de quantification : 1) Etape de récupération des cellules limitée par la formation d'agrégats cellulaires difficiles à solubiliser 2) Transfert du gel d'électrophorèse vers la membrane PVDF ne se faisant pas toujours d'une façon homogène pour toutes les protéines 3) Révélation du signal par chimioluminescence moins sensible que d'autres techniques de révélation comme la fluorescence, les bandes étant saturés.

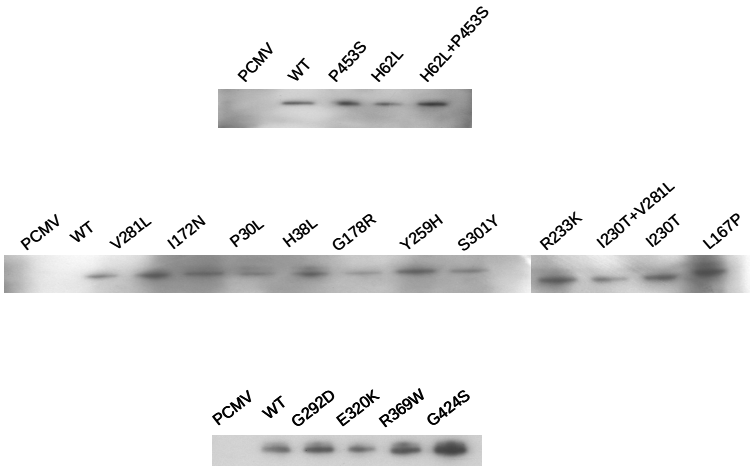


FIGURE 35 : Western blot réalisé pour les différentes protéines récupérées par lyse cellulaire.

En conclusion, la confrontation des données clinico-biologiques et des études *in vitro* nous a amené aux résultats suivants pour les 14 mutations testées, 12 isolées et les deux associations p.H62L+p.P453S et p.I230T+p.V281L (figures 36 et 37). A noter que 2 autres mutations ont été aussi testées *in vitro*, p.R341P et p.R408C, mais les résultats obtenus étaient seulement qualitatifs (photos d'autoradiographie) ; elles étaient publiées entre temps par d'autres équipes et les résulats concordaient avec le phénotype de nos patients, ce qui nous a amenés à arrêter leur étude *in vitro*.

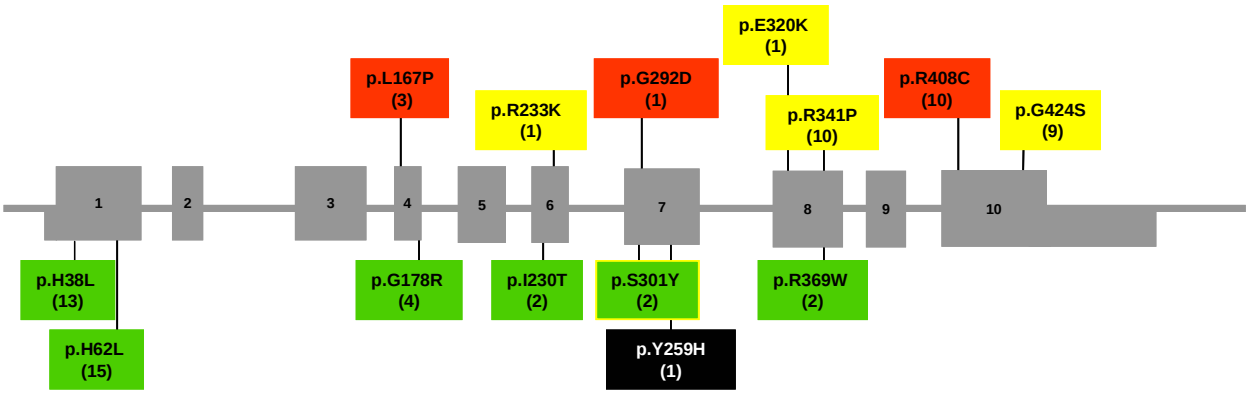


FIGURE 36 : Mutations faux-sens testées in vitro

La couleur attribuée à chaque mutation correspond à la sévérité évaluée par nos études in vitro
Rouge: Activité <1% ; Jaune: Activité faible<15% ; Vert: Activité modérée (20 à 80%) ; Noir: Activité normale

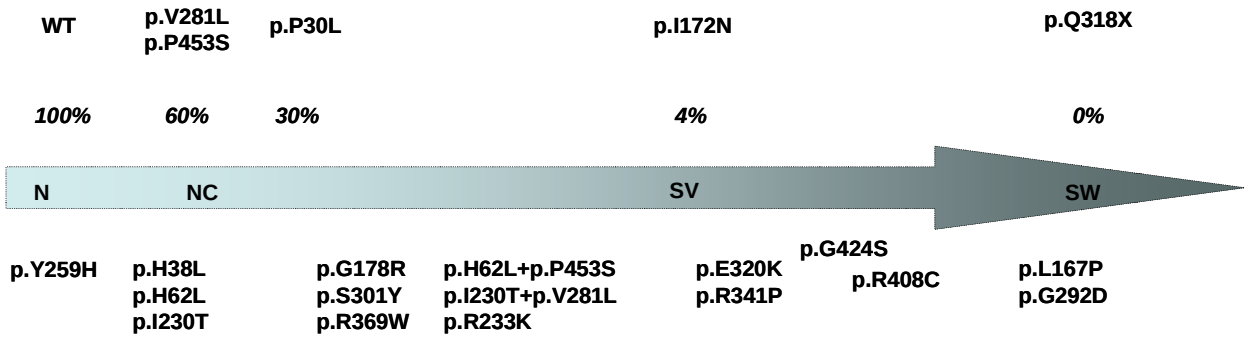


FIGURE 37 : Mutations étudiées *in vitro*, au-dessus les mutations utilsées comme contrôle et au-dessous celles étudiées dans notre laboratoire

IV. Modélisation par homologie du CYP21 : construction du modèle et études *in silico* des nouvelles mutations

Cinq membres de la superfamille des cytochromes P450 sont impliqués dans la biosynthèse surrénalienne des stéroïdes (CYP11A1, CYP17, CYP21, CYP11B1 et CYP11B2). Ces cytochromes utilisent l'oxygène moléculaire et les électrons délivrés par le NADPH afin de catalyser les réactions d'hydroxylations spécifiques. Les produits de ces réactions consistent en l'incorporation d'une molécule d'oxygène au niveau du stéroïde et la libération d'une molécule d'eau.

Les électrons nécessaires à la réaction sont transportés du NADPH jusqu'à l'enzyme via le cytochrome P450 oxydoréductase (Degtyarenko, 1995). Le processus catalytique est complexe et mal élucidé. L'atome ferrique, au centre de la molécule d'hème, paraît être le site du flux d'électrons et un intermédiaire de liaison de l'oxygène et de l'eau. Ainsi les domaines structuraux du CYP21 qui interagissent ave l'hème, le substrat et POR sont cruciaux pour sa fonction.

1. Choix du « template »

Depuis quelques années, plusieurs structures ont été déterminées et déposées dans la Protein Data Bank (Berman et al., 2000). Parmi ces structures, six sont originaires de mammifères ; CYP2C5, CYP2B4, CYP2C9, CYP2C8, CYP3A4 et CYP2D6, les quatre derniers étant des cytochromes P450 humains. Le plus étudié étant le CYP2C5, nous l'avons utilisé pour construire et valider notre modèle 3D de CYP21.

2. Construction du modèle CYP21

Nous avons commencé par analyser la structure primaire de CYP21 pour ensuite arriver à la structure tridimensionnelle de la protéine.

2.1. Alignement des structures primaires des différentes familles de cytochromes P450

Un alignement structural a été réalisé avec plusieurs séquences de cytochromes P450s afin d'analyser la structure des régions conservées. Les séquences homologues au CYP21 humain ont été retrouvées grâce à un « BLAST » réalisé dans la base de données « UNIPROT » (Bairoch et al., 2005) ; elles ont été alignées avec le serveur CLUSTAL W (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) (Thompson et al., 1994) en utilisant les paramètres par défaut du logiciel ; enfin l'alignement a été édité avec le logiciel « Genedoc » (http://www.psc.edu/biomed/genedoc).

Nous avons aligné le CYP21 humain (P08686) avec trois familles de cytochromes P450s:

1) CYP21s d'autres espèces: souris (P03940), rat (Q64562), boeuf (P00191), chèvre (Q7M366), porc (P15540) et chien (Q8WNWO) ;

2) autres cytochromes P450s de la stéroïdogenèse: CYP11B1 (P15538), CYP11B2 (P19099), CYP11A1 (P05108), CYP17A1 (P05093) et CYP19A1 (P11511) ;

3) cytochromes P450s mammifères non stéroïdiens mais déjà cristallisés : CYP2C5 du lapin (P00179), CYP2B4 du lapin (P00178), CYP2C8 humain (P10632), CYP2C9 humain (P11712) et CYP3A4 humain (P08684).

Le pourcentage d'homologie entre CYP21 et les différents cytochromes est plus ou moins important, ce qui nous a permis de repérer les résidus conservés.

2.2. Construction du modèle tridimensionnel du CYP21

2.2.1. Validation du choix du modèle

Après avoir aligné et édité les différentes séquences primaires, nous avons utilisé le modèle tridimensionnel « 2GEG » construit par l'équipe de Robins par homologie avec le CYP2C5 (Robins et al., 2006) et déposé dans la base de données « protein data bank » http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do. Le serveur MATRAS http://biunit.aist-nara.ac.jp/matras/ nous a permis d'aligner les deux structures CYP21 (Sec A) et CYP2C5 (Sec B). Nous avons confirmé l'existence d'une grande homologie de séquences (figure 38), ce qui nous a permis de valider le choix du CYP2C5 comme « template » pour nos analyses ultérieures.

```
     :                     H1            E1       E2     H2
SecA :    S   TTTTTGGGS TT HHHHHHHHHHHH SEEEEESSS EEEEEESHHHHHHHHT
   29:LPPGPTPFPIIGNILQIDAKDISKSLTKFSECYGPVFTVYLGMKPTVVLHGYEAVKEALV:88
      *     *       *     *    *        **     **    ***       ** *
   27:L-H--LPPL-APGFLHLLQPDLPIYLLGLTQKFGPIYRLHLGLQDVVVLNSKRTIEEAMV:82
SecB : - --   S-S  TTTS SSS HHHHHHHHHHS SEEEEESSSSEEEEE HHHHHHHHHT
     : - --    -            H1           E1       E2    H2

     :  H3   E3   H4      -        H-5                       H6
SecA :TTHHHHBEE   HHHHHHTT-T SSSS  H-HHHHHHHHHHHHHTSTTSSSSS HHHHHH
   89:DLGEEFAGRGSVPILEKVSK-GLGIAFSNA-KTWKEMRRFSLMTLRNFGMGKRSIEDRIQ:146
         ****        ***             **         *        * *
   83:KKWADFAGRPEPLTYKLVSKNYPDLSLGDYSLLWKAHKKLTRSALL--LGIRDSMEPVVE:140
SecB :TTTTTT      HHHHHHHTS S STT  SHHHHHHHHHHHHHHHS-- SSS  HHHHHH
     :           H3               H4              --      H5

     :                     H7                     H8
SecA :HHHHHHHHHHTTTT  B TTTHHHHHHHHHHHHHHS    TT HHHHHHHHHHHHHHH
  147:EEARCLVEELRKTNASPCDPTFILGCAPCNVICSVIFHNRFDYKDEEFLKLMESLHENVE:206
           *  *     *          *  **   *       *
  141:QLTQEFCERMRAQPGTPVAIEEEFSLLTCSIICYLTFGDKIK--DDN--LM-PAYYKCIQ:195
SecB :HHHHHHHHHHHHS   SB  HHHHHHHHHHHHHHHHH S   --S S--S -THHHHHHH
     :                   H6                    --   --  - H7

     :    - ---   H9    H10   H11                  -
SecA :HH  -S--- TTHHHH THHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-HHHHHHHS  TT
  207:LLGT-P---WLQVYNNFPALLDYFPGIHKTLLKNADYIKNFIME-KVKEHQKLLDVNNPR:261
              *     *  *  **      ** *      * *     *   *     *
  196:EVLKTWSHWSIQIVDVIP-FLRFFPNPGLRRLKQAIEKRDHIVEMQLRQHKESLVAGQWR:254
SecB :HH  TTTTTT HHHHSS - TTT HHHHHHHHHHHHHHHHHHTTTTHHHHHT   SS
     :           H8     -     H9                     H10

     : H12       ----        H13                                H14
SecA :SHHHHHHHHTS----SS  TT  HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHH
  262:DFIDCFLIKME----QENNLEFTLESLVIAVSDLFGAGTETTSTTLRYSLLLLLKHPEVA:317
     *  *  *         *           *  **   *****  **      ** ***
  255:DMMDYMLQGVAQPSMEEGSGQLLEGHVHMAAVDLLIGGTETTANTLSWAVVFLLHHPEIQ:314
SecB :SHHHHHHHHHHS TTTS  TT  HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHH
     : H11                  H12                                H13

     :                - -- H15   H16                   E4    E5
SecA :HHHHHHHHHHTTTTS  - --THHHHT HHHHHHHHHHHHHHTSSTT S EE SS EEET
  318:ARVQEEIERVIGRHRSP-C--MQDRSRMPYTDAVIHEIQRFIDLLPTNLPHAVTRDVRFR:374
     * ***     *   *       ** * *   * * *  *     *  ***  **
  315:QRLQEELDHELGPGASSSRVpYKDRARLPLLNATIAEVLRLRPVVPLALPHRTTRPSSIS:374
SecB :HHHHHHHHHHT SSS S  STTHHHHT HHHHHHHHHHHHH  SSTT S EE  S EEET
     :                    H14   H15                   E3    E4

     : E6     E7   H17
SecA :TEEE TT EEEEEHHHHHT TTTSSSTTS  GGGGB TTS B   TT  TT  STTS SS
  375:NYFIPKGTDIITSLTSVLHDEKAFPNPKVFDPGHFLDESGNFKKSDYFMPFSAGKRMCVG:434
     * ** ** **  *     **      *  * *  **     *          *  * * * *
  375:GYDIPEGTVIIPNLQGAHLDETVWERPHEFWPDRFLEPGKNS-RA--L-AFGCGARVCLG:430
SecB :TEEE TT EEEE HHHHHT TTTSSSTTS  GGGG  TTS  -  -- - S  GGG  TT
     : E5     E6   H16                           -  -- -

     :H18               E8 ----             E9    E1--0     E11
SecA :HHHHHHHHHHHHHHHHHHEEE----E SS GGG     EE SSSEE--     BEEEE
  435:EGLARMELFLFLTSILQNFKL----QSLVEPKDLDITAVVNGFVSV--PPSYQLCFIPIH:488
     * *** ***  **  ** * *      *     *    *          *    *
  431:EPLARLELFVVLTRLLQAFTLLPSGDALPSLQPLPHCSV------ILKMQPFQVRLQPRG:484
SecB :HHHHHHHHHHHHHHHHHHEE  GGGS SS TTTS   SS------ SS     B  EE
     :H17               E7                   ------           E8

H = Hélice alpha, E = Brin étendue, G = hélice 3/10, I = Hélice pi, T = Tour lié par des liaisons
hydrogènes, S = coude
```

FIGURE 38 : Alignement des structures secondaires du CYP21 et CYP2C5

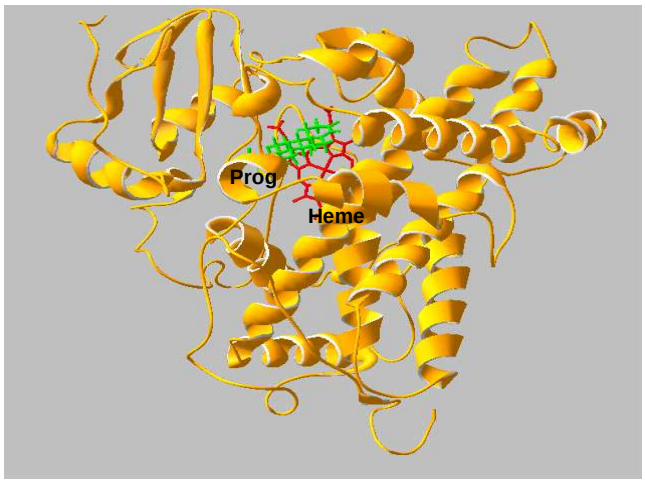


FIGURE 39 : Modèle tridimensionnel du CYP21 avec la progestérone comme substrat

2.2.2 Validation des structures tertiaires

A/ Superposition des deux structures CYP21 (2GEG) et CYP2C5(1N6B) et calcul du rmsd (Root Mean Square Deviation ou déviation structurale)

Une superposition des deux structures tertiaires de CYP21 et CYP2C5 a été réalisée grâce au serveur http://wishart.biology.ualberta.ca/SuperPose/ : d'abord au niveau de certains domaines puis de façon plus globale après fragmentation des structures en plusieurs segments. Le rapport des RMSD (Root Mean Square Deviation ou déviation structurale) est donné. Les résultats sont présentés dans les tableaux 23a et 23b :

TABLEAU 23 : RMSD local (a) et global (b) des deux structures : 1N6B et 2GEG

a)

RMSD Local				
	Carbones alpha	Chaîne carbonée	Lourds	tous
RMSD	0.97	1.11	1.29	1.29
Atomes	46	184	302	302
Structure		**Résidus**		
1N6B chaîne 'A'		424-455, 456-469		
2GEG chaîne 'C'		420-451, 456-469		

b)

RMSD Global				
	Carbones alpha	Chaîne carbonée	Lourds	tous
RMSD	3.61	3.53	3.82	3.82
Atomes	431	1724	2814	2814
Structure		**Résidus**		
1N6B chaîne 'A'		28-30, 37-108, 109-129, 136-139, 140-157, 161-169, 170-187, 190-192, 196-212, 213-220, 222-246, 247-280, 281-285, 286-329, 330-334, 336-418, 423-455, 456-470, 474-478, 480-486, 487-488		
2GEG chaîne 'C'		28-30, 31-102, 108-128, 129-132, 134-151, 152-160, 164-181, 182-184, 185-201, 206-213, 214-238, 240-273, 277-281, 283-326, 331-335, 336-418, 419-451, 456-470, 471-475, 476-482, 487-488		

D'après les résultats du RMSD local trouvé à 1.29 et du RMSD global à 3.82, le modèle de CYP21 (code pdb : 2GEG) possède un repliement similaire à celui de son « template » CYP2C5 (code pdb : 1N6B) ; en effet, il est recommandé d'obtenir une valeur de RMSD inférieure à 4 voire idéalement à 2.

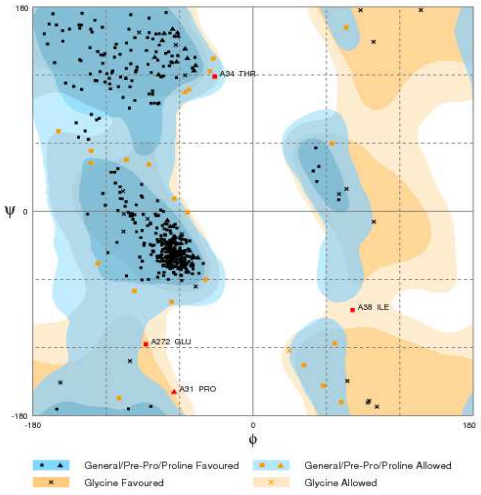
B/ Comparaison des diagrammes de Ramachandran

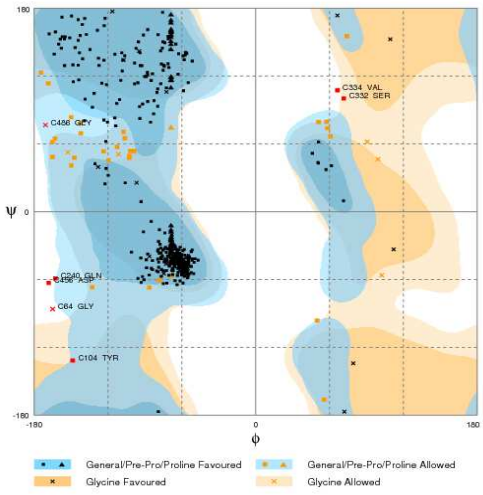
Le modèle CYP2C5 n'intégrant pas le substrat, ceci était insuffisant pour exploiter le domaine de liaison au substrat de CYP21 ; nous avons donc eu recours à un autre modèle, le CYP51, pour pouvoir intégrer la progestérone dans CYP21 (figure 39). La structure du CYP51 avec son substrat (estriol) est bien déterminée (Podust et al., 2004) avec une bonne résolution (1.55Å) et une bonne précision (R = 0.206).

Les diagrammes de Ramachandran des trois structures CYP2C5, CYP21 sans la progestérone, CYP21 avec la progestérone, ont été obtenus grâce au serveur http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php.

Dans un diagramme de Ramachandran, les acides aminés de la structure 3D de la protéine sont répartis dans les différentes zones suivant s'ils sont situés dans un feuillet, une hélice ou si l'AA est une glycine ou une proline. Les résidus proline, glycine, acide aspartique, sérine, asparagine sont majoritairement situés dans les boucles, leucine et méthionine dans les hélices, isoleucine et valine dans les brins. L'histidine est de localisation indifférente. Ainsi, pour les 3 structures, l'analyse des diagrammes de Ramachandran (figures 40 et 41) a révélé que les résidus sont bien majoritairement dans les régions favorables (90-95 %), un petit nombre se trouve dans

les régions autorisées (5-9 %), seulement 4 à 7 résidus se trouvent dans les zones interdites. Ceci nous a permis de valider le modèle 3D de CYP21.

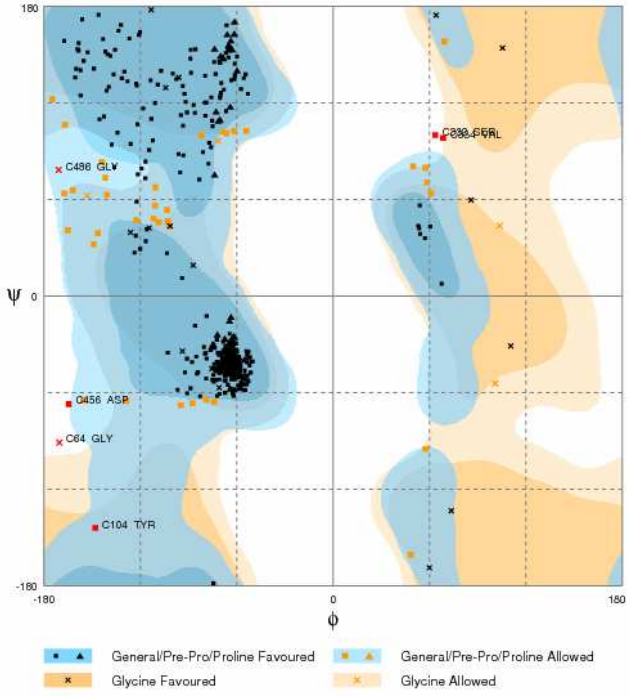




Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 433 (94.1%)
Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 23 (5.0%)
Number of residues in outlier region : 4 (0.9%)

Number of residues in favoured region (~98.0% expected): 422 (90.6%)
Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 37 (7.9%)
Number of residues in outlier region : 7 (1.5%)

FIGURE 40 : Diagramme de Ramachandran du CYP2C5 (1n6b) à gauche et du CYP21 (2GEG) à droite



Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 420 (90.1%)
Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 40 (8.6%)
Number of residues in outlier region : 6 (1.3%)

FIGURE 41 : Diagramme de Ramachandran du 2GEG après l'ajout du substrat

2.3. Exploitation du modèle : analyse des domaines spécifiques

Du fait de la difficulté à purifier l'enzyme 21-hydroxylase et avant la cristallisation des cytochromes bactériens, le modèle CYP21 proposé par mutagenèse dirigée comportait 6 parties qui se suivent dans la séquence primaire de la protéine et qui sont les suivantes :

- Séquence de 23 résidus hydrophobes au niveau de l'extrémité amino-terminale de la protéine qui forment la queue hydrophobe et sont responsables de la translocation de la protéine vers la membrane du réticulum endoplasmique lisse ;
- Séquence composée des acides aminés 167-178 qui interrompent le processus de translocation et permettent l'ancrage à la membrane ;
- Domaine de liaison au substrat situé au niveau des acides aminés 342-358 ;
- Domaine de liaison au partenaire redox composé des acides aminés 338-361 ;
- Domaine de liaison à l'hème formé des acides aminés 421-440 ;
- Extrémité carboxy-terminale de fonction inconnue.

En fait, l'étude structurale des différents cytochromes P450s bactériens puis mammifères montre que les domaines fonctionnels sont répartis d'une manière plus complexe au sein de la protéine et nous les avons détaillés dans les paragraphes suivants.

2.3.1 Domaine d'ancrage à la membrane du réticulum endoplasmique

Les cytochromes mammifères cristallisés depuis l'an 2000 sont tous ancrés à la membrane d'où la difficulté de cristalliser la partie N-terminale et d'identifier les acides aminés de la région. La seule solution est l'utilisation de logiciels qui permettent de déterminer les patchs hydrophobes impliqués dans l'ancrage membranaire.

N'ayant pu avoir accès à ces logiciels, nous avons retenu comme patchs hydrophobes ceux publiés par l'équipe de Williams (Williams PA et al., 2000) et celle de Robins (Robins et al.,2006) (voir la partie Rappels Bibliographiques, chapitre II.4.1).

2.3.2 Domaine de liaison à l'hème

A/ *<u>Résidus se trouvant à 5 Å de l'hème</u>*

Par homologie avec les autres cytochromes P450, le domaine de liaison à l'hème est compris entre les hélices I et L. Contrairement à la séquence globale de la protéine moyennement conservée (environ 32 %) au sein de la superfamille des cytochromes P450s, CYPs procaryotes et CYPs mammifères, la structure 3D du domaine de liaison à l'hème est hautement conservée.

Ceci est en accord avec le fait que plus de 60 % des résidus de ce domaine sont conservés entre CYP21 et CYP2C5, alors que seuls 32 % d'identité globale existent entre les deux structures.

Les résidus situés dans une sphère de 5 Å par rapport à l'hème sont les suivants :

- M81 et R91 situés au niveau de l'hélice B et de la boucle B-B'
- L107-L109, W116 au niveau de l'hélice C
- I172 au niveau de l'hélice E
- D287, L288, G291, G292, T295, T296, T299 au niveau de l'hélice I
- L353, V358, V359, A362-H365, L388 au niveau de la boucle K-K'
- A420-G422, R426-G430, L433, A434, E437, L438 aux environs de l'hélice L.

B/ *Coordination aux propionates de l'hème*

L'hème est stabilisé par au moins cinq acides aminés formant la coordination aux chaînes latérales des propionates de l'hème : W116 et K120 dans l'hélice C, H365 dans le feuillet β1-4, F421 et R426 dans la poche à cystéine (figure 42).

C/ *Poche à cystéine*

L'hème est lié de façon covalente à la cystéine C428 située dans la boucle liant les hélices K et L. Cette cystéine est strictement conservée au sein des différentes familles de cytochromes P450. D'autres résidus potentiellement impliqués dans la coordination à l'hème sont la thréonine 295 et la glycine 291.

Les différents AA impliqués dans la liaison à l'hème sont présentés dans la figure 43.

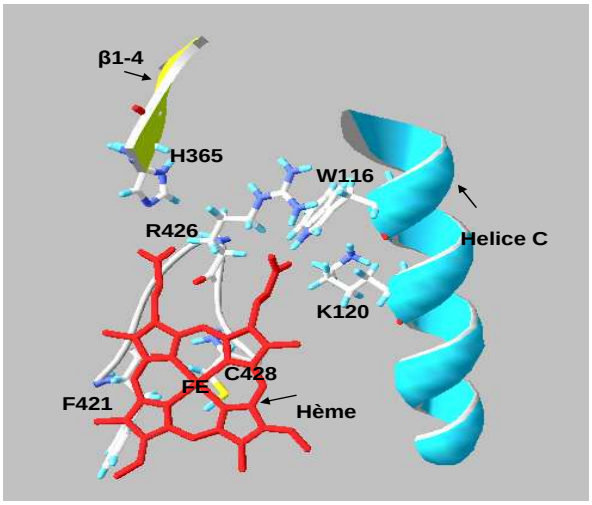


FIGURE 42 : Acides aminés impliqués dans la liaison à l'hème.

D/ Meander et triade ERR

Le meander est une séquence de 20 AA (AA 400-420) avec une structure dite « serpentée » représentée en noir dans la figure 43 ; elle participe à la stabilisation de la structure 3D. En effet, la triade Glu351/Arg354/Arg408 forme un motif dans le meander, bloquant ainsi la poche à cystéine dans sa position ; ceci qui permet une association stable entre la protéine et l'hème (figure 43).

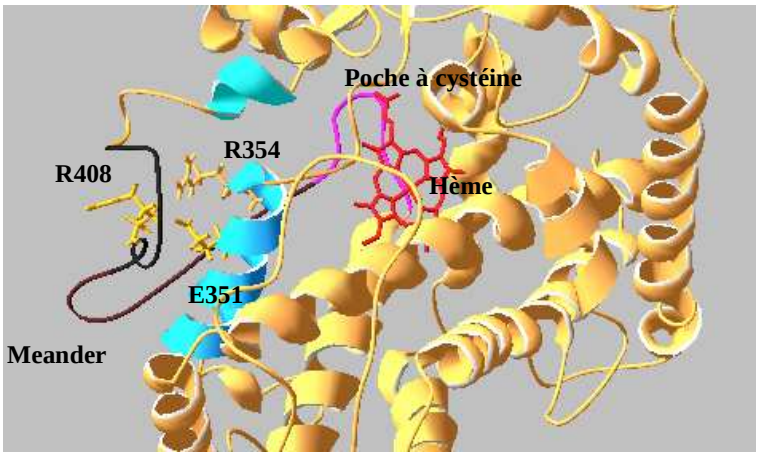


FIGURE 43 : Triade Glu/Arg/Arg (triade ERR) jouant un rôle dans la stabilité de la structure tridimensionnel de la protéine

2.3.3 Domaine de liaison au substrat

Les résidus impliqués dans la liaison au substrat ne sont pas conservés au sein des différents cytochromes puisque leurs substrats sont différents. La variabilité de ce domaine complique donc sa détermination par les études de modélisation. Comme expliqué dans le paragraphe relatif à la construction du modèle, nous avons utilisé le modèle CYP51.

Ainsi, la superposition de CYP51 et CYP21 avec ajout de la progestérone a révélé que 21 résidus étaient dans une sphère de 5 Å autour du substrat, ils sont les suivants :

- R91 situé dans la boucle entre les hélices B et B' (SRS-1),
- L107-G110 dans la boucle entre les hélices B'et C (SRS-1) ;
- H203-I206 dans la boucle connectant les hélices F et G' où se trouve le site d'entrée du substrat ou « mouth of active site channel » (SRS-2 et 3) ;
- D287, I290-G291 et T295 dans la partie centrale de l'hélice I (SRS-4) ;
- V358-P364 dans la boucle entre l'hélice K et le feuillet β1-4 (SRS-5);
- R426 dans la boucle entre les hélices K'et L

Ces résidus correspondent aux six différents sites de reconnaissance du substrat (SRS) identifiés par Gotoh et al (Gotoh, 1992) (voir rappels bibliographiques, chapitre II-4.4.) Cependant, par rapport aux résultats de cette équipe, nous avons constaté l'existence de décalages mineurs dans la localisation des AA situés dans les SRS1 à 3 (figure 44). De même le SRS-6 n'a pas été identifié au niveau du CYP21, seul l'arginine 426 se trouvant dans la poche à cystéine a été répéré dans une sphère de 5Å autour de la progestérone.

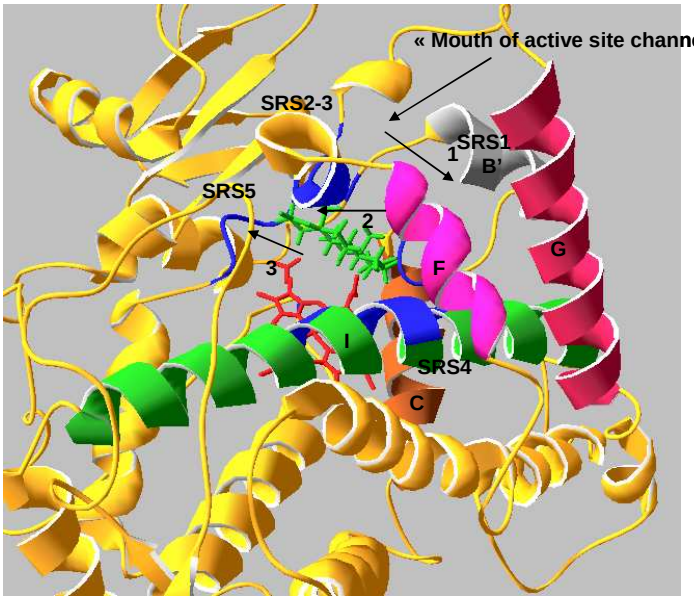


FIGURE 44 : Sites de reconnaissance du substrat SRS 1 à 5, Sites 2 et 3 correspondant au site d'entrée du substrat ou « Mouth of active site chanel ».

2.3.4 Domaine de liaison aux partenaires d'oxydo-réduction

Bien qu'étudié par plusieurs équipes dans le monde, il a fallu plusieurs années pour parvenir à l'exploiter.

A/ Historique

Les mécanismes électrostatiques jouent un rôle primordial dans l'orientation des résidus chargés positivement situés à la surface de CYP21 et ceux chargée négativement de la P450 oxydoréductase; de plus, le caractère hydrophobe de la membrane du réticulum endoplasmique contribue à l'alignement de CYP21 avec POR (Hlavica et al., 2003).

Les premières études réalisées par l'équipe de Ravichandran sur le CYP102 (Ravichandran et al., 1993) ont révélé que les résidus 338-361 étaient potentiellement impliqués dans ces interactions. Ces résidus pour la plupart basiques et étant des arginines, ont été décrites par la suite comme le siège de mutations responsables du déficit en 21-hydroxylase p.R339H, p.R341P/W, p.R354H, p.R356Q/W/P (Lajic et al., 1997b).

Puis, la modélisation et les études expérimentales réalisés sur le cytochrome CYP17 ont confirmé le rôle des arginines 347 et 358 dans les interactions avec les partenaires d'oxydo-réduction (Auchus and Miller, 1999), (Geller et al., 1999). Les résidus R347 et R358 du CYP17 correspondent aux résidus R339 et R341 respectivement de CYP21. Des mutations ont été identifiées chez les patients atteints de déficit en 21-hydroxylase : la p.R339H responsable de la forme non classique, les mutations p.R341P et p.R341W responsables de la forme classique.

Par la suite, l'étude du cytochrome mammifère CYP2B4, a souligné l'importance de 12 acides aminés chargés positivement dans la liaison au partenaire d'oxydo-réduction (Scott et al., 2003).

Quelques années plus tard, l'équipe de Robins et al. a étudié cette région en superposant les deux structures CYP2B4 et CYP21 à l'aide du logiciel « ICM ». La superposition montre que six acides aminés de même charge sont conservés, dont cinq sont localisés dans la même région. Ces six résidus basiques sont : K117 et K121 dans l'hélice C, R132 dans l'hélice D, R414 dans la boucle entre K'' et K''', R426 dans l'hélice K''' et R435 dans l'hélice L.

Enfin l'étude de la structure 3D du CYP2B4 (1SUO) (Scott et al., 2004) utilisé par l'équipe de Janner et al. (Janner et al., 2006) a identifié d'autres résidus basiques impliqués.

B/ Résultats de notre analyse à l'aide du logiciel « Deep View »

Nous nous sommes basés sur les études des autres équipes pour identifier plus précisément les résidus impliqués dans l'oxydo-réduction ; nous avons utilisé pour notre analyse le logiciel Deep View, en se basant sur deux modèles de CYP2B4 : 1PO5 et 1ISUO.

a- Superposition de CYP21 (2GEG) et CYP2B4 (1PO5)

Nous avons superposé les deux modèles 2GEG et 1PO5 puis comparé nos résultats avec ceux de l'équipe de Robins et al. (Robins et al., 2006). Le résidu le plus proche à celui étudié dans CYP2B4 (rms aux alentours de 2 Å) a été considéré comme celui impliqué dans l'interaction avec le partenaire d'oxydo-réduction. A noter que quelques résidus alignés avec ceux de CYP2B4 ne sont pas basiques.

Les résultats sont présentés dans le tableau 24 et la figure 45.

TABLEAU 24 : Résidus impliqués dans l'oxydo-réduction d'après le modèle 1PO5

AA dans 1PO5	AA déduit dans CYP21	AA basique correspondant dans CYP21	AA d'après Robins
R122	S113	K117	K117
R126	K117	K120 ou 121	K121
K139	R132		R132
R133	R124		L128
K225	P213	R216	R216
R232	L223	R224-225	R224
R253	K245		K245
K384	E380		E380
R424-R422 ?	K414		K414
K433	A425	R426	R426
R443	R435		R435
K251	Q243		Q243

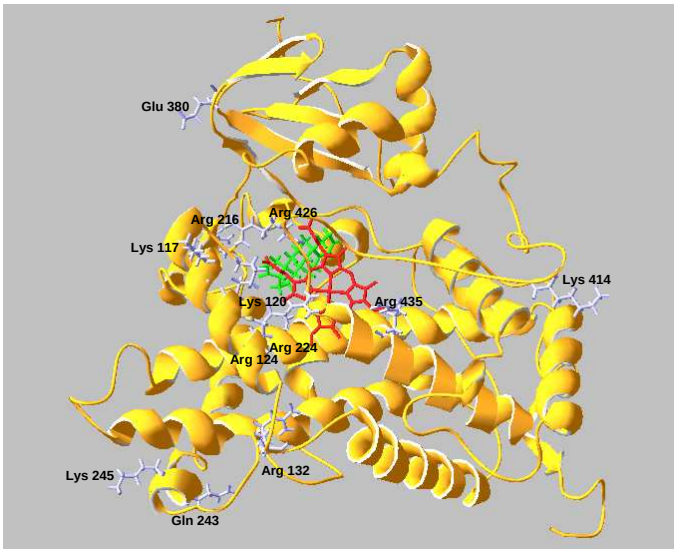


FIGURE 45 : Résidus impliqués dans la réaction d'oxydo-réduction d'après la superposition CYP21 et CYP2B4

Nous avons constaté une bonne concordance entre nos résultats et ceux de l'équipe de Robins.

b- Superposition de CYP21 (2GEG) et CYP2B4 (1SUO)

Le modèle 1SUO a été utilisé par l'équipe de Janner en 2006 (Janner et al.,2006). Les résidus basiques identifiés sont dans le tableau 25.

TABLEAU 25 : Résidus impliqués dans l'oxydo-réduction d'après le modèle 1SUO

AA dans 1SUO	AA basique correspondant dans CYP21
R98	R91
R125	-
H369	H365
S430	-
R434	R426

Ces résultats montrent une discordance avec les résultats obtenus à l'aide du modèle précédent 1PO5, soulignant la difficulté d'exploitation du domaine d'oxydo-réduction.

2.3.5 Interaction entre le cytochrome P450 oxydoréductase (POR) et CYP21-Modélisation de l'interaction ou « Docking »

Nous avons dû dans un premier temps construire le modèle de POR impossible à cristalliser, ce cytochrome étant lui aussi lié à la membrane du réticulum endoplasmique.

A/ Identification des différents domaines de POR

Nous avons construit le modèle de POR humain (NP_000932) grâce au modèle du rat (NP_113764) (code pdb 1AMO), les deux ayant 96% d'identité de séquences (figure 47).

Nous avons identifié par alignement entre les deux structures primaires, les différents domaines de liaison aux partenaires d'oxydo-réduction (figure 46).

FIGURE 46 : Séquence des domaines de liaison aux cofacteurs au niveau du POR humain

Puis, grâce au logiciel « DEEP VIEW », la structure 3D de POR a été obtenue (figure 47).

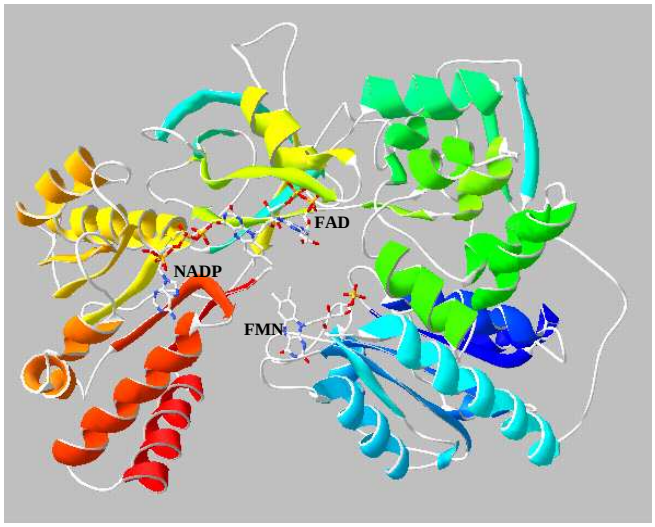


FIGURE 47 : Modélisation par homologie du POR humain à partir du POR du rat (code PDB: 1AMO)

Une fois les modèles 3D de CYP21 et de POR construits et obtenus sous format pdb, nous avons tenté de modéliser les interactions entre les deux modèles 3D.

B/ Docking de CYP21 avec son partenaire d'oxydo-réduction POR - utilisation du logiciel « HEX »

L'analyse des deux cytochromes a été réalisée avec le serveur « HEX» déjà utilisé par d'autres équipes (Pandey et al., 2007). Nous nous sommes basés sur leurs résultats pour tenter de caractériser la relation entre les deux cytochromes. Le travail du logiciel a été guidé par l'entrée de l'arginine 426, élément de cette intéraction (figure 48).

La difficulté a résidé dans l'interprétation des résultats ; ce docking permet de visualiser un contact entre l'hème du CYP21 et le domaine FMN de POR mais vu que ce n'est pas une interaction dynamique qu'on obtient il est difficile d'identifier les résidus de l'interface de ces deux protéines.

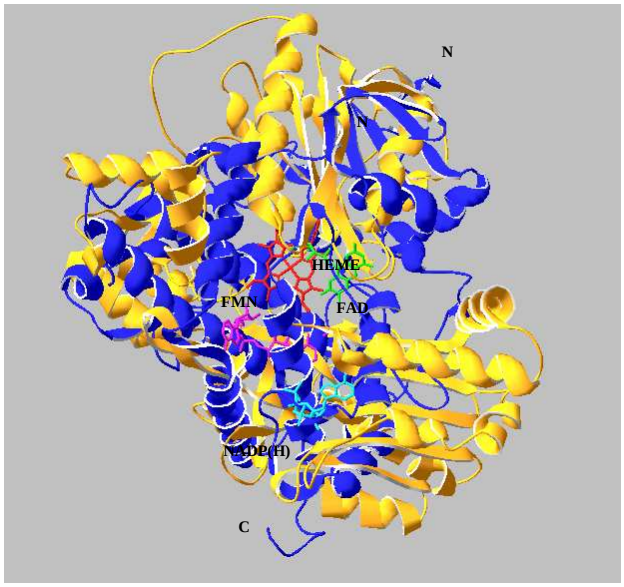


FIGURE 48 : Résultat de l'interaction du CYP21 avec POR obtenu avec le serveur « HEX »

3. Utilisation du modèle pour étudier la conséquence des mutations

Nous avons réalisé les études *in silico* pour les 85 mutations rares de notre cohorte, en commençant par les 29 déjà étudiées *in vitro*, puis les 30 dont la sévérité est déduite du phénotype et enfin les 26 dernières mutations pour lesquelles seule la modélisation allait nous aider à prédire leur sévérité.

Pour chacun de ces 3 groupes, les substitutions sont présentées par ordre de sévérité décroissant et pour chacune d'elles, nous avons analysé les paramètres permettant d'évaluer leur retentissement :

- caractéristiques du changement d'acides aminés : conservation de l'AA muté, écart physico-chimique entre les deux acides aminés évalué par la distance de Grantham, localisation dans la protéine, rôle de l'acide aminé dans la fonction protéique d'après l'analyse de notre modèle, prédiction par les logiciels informatiques (Polyphen et SIFT) ;
- Résultats des études *in vitro* pour le 1er groupe, du phénotype pour le groupe 2. Concernant le groupe 3, seules les études *in silico* ont permis de prédire la sévérité.

L'analyse approfondie du changement d'acides aminés permet d'avoir une première idée sur l'importance du résidu étudié. La conservation de cet AA au sein des CYP21s des différentes espèces (figure 51), des autres cytochromes mammifères (figure 52) et des autres cytochromes de la stéroïdogénèse (figure 53) est en faveur du caractère sévère de la mutation ; cependant, il faut noter que dans certains cas, notamment pour les AA impliqués dans la spécificité au substrat, ils ne sont pas conservés entre les cytochromes et pourtant les mutations les affectant peuvent être sévères. Ceci sera démontré dans les paragraphes traitant des mutations affectant ces AA. L'écart physico-chimique entre les deux AA est un deuxième critère de sévérité, caractérisé par la distance de Grantham ; le remplacement d'un acide aminé par un de classe proche a une répercussion moins sévère que le remplacement par un acide aminé de classe très différente, et ce quelle que soit sa localisation.

La localisation de l'acide aminé dans la protéine est un élément important, les mutations sévères sont toujours situées dans des régions critiques pour la fonction enzymatique.

Enfin, nous avons utilisé les logiciels de prédiction « Polyphen » et « SIFT » qui se basent sur les alignements des cytochromes de famille proches pour évaluer la conséquence des mutations ; nous avons ainsi évalué leur informativité mais aussi leurs limites.

3.1. Etude *in silico* des mutations testées *in vitro*

Parmi les 29 mutations étudiées *in vitro*, 18 étaient publiées dans la littérature et 12 testées dans notre laboratoire ; la mutation p.G178R avait déjà été publiée mais comme les résultats ne concordaient pas avec le phénotype de nos patients, nous l'avons réétudiée au laboratoire.

Ces mutations sont présentées dans le tableau 27 et séparées en 4 groupes :

- Groupe 1 : mutations sévères responsables d'une forme classique avec ou sans perte de sel clinique ;
- Groupe 2 : mutations intermédiaires ;
- Groupe 3 : mutations modérées ;
- Groupe 4 : polymorphismes.

Au sein de chaque groupe, nous avons présenté les mutations dans l'ordre du gène donc en partant de la structure primaire de la protéine, ce qui nous a permis de mettre en évidence les domaines fonctionnels (voir figure 54).

3.1.1 Groupe 1 : Mutations sévères

Tous les résidus sièges de mutations sévères sont situés dans les domaines essentiels de la protéine : triade « ERR », domaine de liaison à l'hème et au substrat, site actif, domaine de catalyse impliqué dans la réaction d'oxydo-réduction, stabilité de la protéine.

Les 16 mutations sévères avec leur localisation dans un des domaines fonctionnels, sont présentées dans le tableau suivant :

TABLEAU 26 : Mutations situées dans des domaines importants

ERR triade	domaine de liaison à l'hème	Liaison au substrat	Site actif	Interaction partenaires d'oxydo-réduction	Stabilité protéique
p.R354H	p.H119R	p.I77T	p.L166P	p.R341P	p.E320K
p.R408C	p.G424S	p.R233K	p.L167P	p.R356Q	p.R483P
	p.R426H		p.G291S		p.R483Q
			p.G292D		

a) Triade « ERR »

La triade « Glu351/Arg354/Arg408 » joue un rôle dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle du cytochrome P450. Deux mutations affectant un des résidus de ce motif ont été publiées dans la littérature : p.R354H et p.R408C, toutes les deux responsables de la forme classique avec perte de sel clinique. Plusieurs études fonctionnelles portant sur un des 3 résidus de la triade confirment leur importance pour la fonction enzymatique (Chen and Zhou, 1992), (Furuya et al., 1989), (Kitamura et al., 1991), (Krone et al., 2005b), (Shimizu et al., 1991). Le modèle tridimensionnel montre que les substitutions touchant le résidu R354 entraînent la perte d'interactions avec les résidus E351 et E403 qui sont essentiels pour le maintien de la structure tridimensionnelle du cytochrome CYP21. De même, pour la substitution de l'arginine 408 en cystéine qui semble avoir des conséquences dramatiques sur la structure et abolir la fonction enzymatique.

Ainsi, ces caractéristiques structurales concordent avec le phénotype sévère de nos patients porteurs d'une de ces deux mutations et confirment l'importance de la triade ERR, domaine fondamental de la structure protéique.

b) Domaine de liaison à l'hème, poche à cystéine et coordination aux propionates

Malgré une faible identité globale de séquences entre les cytochromes (environ 25 %), le domaine de liaison à l'hème est une région hautement conservée, notamment les AA présents au niveau de la poche à cystéine (421-428). Le fer de l'hème est lié par une liaison sulfure à la cystéine 428 qui est située dans la boucle entre les hélices K et L. Par ailleurs, rappelons que les propionates de l'hème interagissent avec les chaînes latérales des résidus W116 et K120 de l'hélice C, du résidu H365 du feuillet β1-4 et des résidus F421 et R426 de la poche à cystéine.

Les mutations p.H119R, p.G424S et p.R426H situées dans cette région paraissent responsables de la forme classique d'après les études *in vitro* et le phénotype des patients, exceptée la p.H119R publiée dans la littérature comme modérée. Ce résidu est peu conservé ; la sévérité de la mutation p.H119R peut être expliquée par la localisation du résidu H119 dans l'hélice C avec donc possible altération de la liaison à l'hème et de la coordination aux propionates.

La glycine 424 ainsi que l'arginine 426 sont strictement conservées au sein des cytochromes. La glycine 424, élément de la poche à cystéine, participerait à la formation de la protubérance. L'arginine 426 est située au niveau de la poche à cystéine et c'est l'un des quatre résidus importants pour la coordination aux propionates.

c) Domaine de liaison au substrat

Ce domaine est spécifique pour chaque cytochrome, la conservation de l'acide aminé des résidus situés dans cette région ne peut donc pas être utilisée comme critère de sévérité. A l'inverse l'écart physico-chimique entre l'acide aminé normal et le muté est un paramètre important.

Deux mutations ont été identifiées dans ce domaine, les mutations p.I77T et p.R233K. L'isoleucine 77 est localisée au niveau de l'hélice B (Krone et al.,2005), à proximité du premier site de reconnaissance du substrat SRS1. Le changement en une thréonine, de classe différente, doit interférer avec les glycines 90 et 110 impliquées dans l'ouverture de la protéine et l'entrée du substrat.

L'arginine 233 est située dans l'hélice G, importante pour la reconnaissance initiale du substrat. Deux canaux d'accès du substrat reliant la surface de la protéine au site actif ont été décrits pour le cytochrome CYP2C5 (Johnson et al., 2002) et les deux impliquent l'hélice G. Ainsi le

remplacement de l'arginine par une lysine doit perturber la spécificité au substrat, ce qui peut expliquer la faible activité résiduelle constatée *in vitro.*

d) Site actif

Le site actif de la protéine comprend le milieu de l'hélice I dont les résidus sont impliqués dans la liaison à l'hème et au substrat. L'alignement structural des cytochromes montre que la poche de liaison à l'oxygène ou « oxygen-binding pocket » est formée par la connexion des résidus G291 et T295 via des liaisons hydrogènes (Poulos et al., 1987), (Ravichandran et al., 1993), (Williams et al., 2000b).

Les leucines 166 et 167 strictement conservées au sein des espèces, sont localisées dans l'hélice E qui interagit avec l'hélice I et la positionne en face de l'hème (Mornet and Gibrat, 2000), (Ravichandran et al., 1993). Leur transformation en une proline, connue pour rompre les conformations des hélices, doit perturber la conformation de cette hélice E et donc son interaction avec l'hélice I. En déstabilisant l'architecture du cytochrome, ces deux mutations sont responsables de la perte d'activité enzymatique.

Les glycines 291 et 292 sont situées au centre de l'hélice I, à une distance inférieure à 5Å de l'hème et du substrat. La transformation d'une glycine sans chaîne latérale en une sérine en position 291 ou un acide aspartique en position 292, entraîne une modification de la charge et un encombrement stérique responsables de l'abolition de l'activité enzymatique.

e) Interactions avec POR

Les études expérimentales indiquent que les résidus basiques du côté proximal du cytochrome P450 (en respectant l'hème) interagiraient avec les résidus acides présents à la surface de POR (Hlavica et al., 2003). Deux mutations sévères ont été identifiées dans cette région, p.R341P et p.R356Q.

L'arginine 341 est un des candidats potentiels pour l'oxydo-réduction, la mutation p.R341P élimine un acide aminé de charge positive important pour l'interaction électrostatique avec POR et introduit une proline avec rupture de l'hélice.

Plusieurs mutations affectant le résidu R356 ont été décrites, notamment la p.R356Q dans notre cohorte, responsable de la forme classique du fait de perturbations électrostatiques.

f) Résidus impliqués dans la stabilité de la protéine

Trois mutations semblent altérer la stabilité protéique, p.E320K, p.R483P et p.R483Q, probablement par défaut de repliement. En effet l'arginine 483, appartenant à la région chargée positivement LQPR^{483}G, forme avec la région chargée négativement EE^{320}LD^{322}H ainsi que la surface hydrophobe composée des résidus 446-448, un noyau de repliement fondamental pour les étapes initiales de compression de la protéine (Lepesheva et al., 2001).

La mutation p.R483P, étudiée par Nikoshkov et al.98 (Nikoshkov et al., 1998), entraîne une diminution très importante de l'activité enzymatique *in vitro* et un phénotype sévère chez les patients, probablement par diminution d'expression de la protéine qui est mal repliée. La p.R483P laisse persister une activité un peu plus importante que la p.R483Q (1% / 4% vs 1% / 2 % pour la 17-OHP et la Progestérone respectivement). Ceci peut être expliqué par le fait que la glutamine ne perturbe pas la structure des hélices comme la proline.

L'acide glutamique 320, élément de la région chargée négativement EE^{320}LD^{322}H, est strictement conservée entre les différents types de cytochromes P450 et est également impliquée dans le repliement de la protéine. Le changement de l'acide glutamique de charge négative en une lysine de charge positive doit ainsi empêcher ce repliement.

3.1.2 Groupe 2 : Mutations intermédiaires

Deux mutations ont été incluses dans ce groupe : p.S301Y et p.R369W. D'après le phénotype de nos patients, elles semblent responsables d'un phénotype intermédiaire tandis que d'après les études fonctionnelles, l'activité enzymatique résiduelle est entre les deux mutations modérées p.P30L et p.V281L.

L'analyse de leur localisation dans la protéine montre que ces deux mutations affectent le domaine de catalyse. La sérine 301, bien conservée au sein des espèces, est à proximité du site actif et la substitution par une tyrosine modifie la charge de l'AA, donc doit altérer les interactions électrostatiques. L'arginine 369 est située à moins de 5Å de l'acide glutamique 380 connue comme impliquée dans la réaction d'oxydo-réduction (Hsu et al., 1999), (Robins et al., 2006). La substitution de l'arginine basique par le tryptophane hydrophobe entraîne un changement de polarité donc perturbe également les interactions électrostatiques. Le fait que ce résidu ne soit pas conservé et qu'il soit situé à proximité de la surface du cytochrome peut expliquer que la mutation p.R369W soit responsable d'une forme intermédiaire entre la forme non classique et la forme classique.

3.1.3 Groupe 3 : Mutations modérées

Les mutations appartenant à ce groupe touchent des acides aminés situés dans des domaines moins importants pour la fonction enzymatique, excepté la p.R339H située dans le domaine d'oxydo-réduction. Soit elles sont dans le domaine d'ancrage à la membrane (mutations p.H38L et p.H62L), soit elles ont une liaison indirecte avec le site actif (mutations p.G178R et p.V304M) ou avec le substrat (mutation p.I230T). Les mutations p.A391T et p.P482S affectent des acides aminés qui ne sont pas connus comme étant dans un domaine fonctionnel.

L'histidine 38 est localisée au niveau du premier patch hydrophobe incluant les acides aminés 25-39, l'histidine 62 au niveau du deuxième patch incluant les acides aminés 54-63. Les résidus basiques de ce patch auraient pour rôle la prévention de la translocation de la protéine à l'intérieur du réticulum endoplasmique suite à la co-translation des résidus hydrophobes du patch (Williams et al., 2000a). La substitution du résidu histidine basique par la leucine hydrophobe pourrait augmenter l'immersion de la protéine dans la membrane et perturber ainsi la fonction de l'enzyme.

La glycine 178, relativement conservée, est située à la surface du cytochrome CYP21, c'est le premier résidu de la boucle qui suit l'hélice E. Elle est donc juste après les leucines 166 et 167 citées précédemment comme jouant un rôle dans le positionnement de l'hélice I avec l'hème. On peut emettre l'hypothèse que le remplacement de la glycine 178 par une arginine basique avec une chaîne latérale, perturbe ce positionnement.

L'isoleucine 230 n'est pas très conservée au sein des différents cytochromes. La structure du CYP2C5 montre l'existence d'un réseau de liaisons hydrogènes créé par l'association des molécules d'eau à plusieurs acides aminés dont le résidu I230 (Wester et al., 2003a). Grâce à ce réseau, la partie polaire du substrat serait intégrée dans le site actif. Le remplacement d'une isoleucine hydrophobe par une thréonine polaire pourrait changer l'interaction des molécules d'eau et perturber ainsi la traversée du substrat.

Enfin, la p.R339H, certes située dans le domaine d'oxydo-réduction, doit être modérée du fait d'un écart-physico-chimique entre les deux AA peu important.

3.1.4. Groupe 4 : Polymorphismes

Trois variations de séquences ont été identifiées : p.M239K, p.Y259H et p.A265V. Aucun de ces résidus n'appartient à un domaine essentiel de la protéine, et les résidus touchés

par ces variations ne sont pas conservés au sein des cytochromes ; ceci pourrait expliquer l'activité normale de la protéine.

TABLEAU 27 : Etude *in silico* des mutations étudiées *in vitro*

Mutation	Conservation AA	Changement d'AA 1-Ecart physico-chimique 2-Distance de Grantham [0-215]	Gène (exon)	Protéine Structure secondaire	Rôle de l'AA dans la fonction protéique	Logiciels de prédiction Polyphen SIFT	Phénotype	Activité in vitro 17-OHP / P	Références
Mutations	**sévères**								
p.H119R	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	His – Arg peu important DG = 29	3	Hélice C	Liaison à l'hème Oxydo-réduction	Probably damaging 0	SV	31.6% / 32.5%	(Concolino et al., 2009a)
p.L166P	Espèces: (+) Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Leu - Pro important DG = 98	4	Hélice E	Contact avec hélice I (site actif)	Possibly damaging 0	SW	0.3% / 0.4%	(Robins et al., 2007)
p.L167P	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Leu - Pro important DG = 98	4	Hélice E	Contact avec hélice I (site actif)	benign 0.1	SW/SV	0.7% / 0.4%	Notre équipe
p.G291S	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Gly - Ser peu important DG = 56	7	Hélice I	Site actif	Possibly damaging 0.1	SW	0.8% / 0.8%	(Wedell et al., 1992) (Nikoshkov et al., 1998)
p.G292D	Espèces: + Mammifères : + Stéroïdogenèse : -	Gly - Asp important DG = 94	7	Hélice I	Site actif	Probably damaging 0	SW/SV	0.5% / 0.7%	Notre équipe
p.R354H	Espèces: + Mammifères : + Stéroïdogenèse : +	Arg - His peu important DG = 29	8	Boucle	ERR triade	benign 0	SW	0%	(Lobato et al., 1999) (Nunez et al., 1999)
p.R408C	Espèces:+ Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : (+)	Arg - Cys : très important DG = 180	10	Hélice K'	ERR triade	benign 0	SW	1.3%/0.6%	(Billerbeck et al., 2002) (Soardi et al., 2008)
p.I77T	Espèces: + Mammifères: (+) Stéroïdogenèse: (+)	Ile - Thr : important DG = 89	2	Hélice B	Flexibilité et entrée du substrat	Possibly damaging 0.4	SV	3%/5%	(Krone et al., 2005c)
p.E320K	Espèces: + Mammifères : + Stéroïdogenèse : +	Glu - Lys : peu important DG = 56	8	Hélice J	Repliement protéine	Probably damaging 0	SW/SV	4.6% / 4.5%	Notre équipe
p.R341P	Espèces: - Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg – Pro : important DG = 103	8	Hélice J'	Oxydo-réduction	Possibly damaging 0.2	SV	0.7% / 0.7%	(Robins et al., 2007)
p.R356Q	Espèces:+ Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg - Gln : peu important DG = 43	8	Boucle	Oxydo-réduction	benign 0.1	SV	0.65% / 1.1%	(Lajic et al., 1997a)
p.G424S	Espèces:+ Mammifères : + Stéroïdogenèse : +	Gly - Ser : peu important DG =56	10	Boucle	Poche à cystéine	Probably damaging 0	SV	1.6% / 2%	Notre équipe
p.R426H	Espèces:+ Mammifères : + Stéroïdogenèse : +	Arg - His : peu important DG = 29	10	Boucle	Poche à cystéine Coordination aux propionates	Probably damaging 0	SV	0.5%/0.4%	(Baumgartner-Parzer et al., 2001) (Barbaro et al., 2006)
p.R483P	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg - Pro : important DG = 103	10	Boucle	Repliement et stabilité	Probably damaging 0	SV	1.0% / 2.2%	(Wedell and Luthman, 1993a) (Nikoshkov et al., 1998)
p.R483Q	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg - Gln : peu important DG = 43	10	Boucle	Repliement et stabilité	Probably damaging 0	SW/SV	1.1% / 3.8%	(Stikkelbroeck et al., 2003) (Robins et al., 2007)

p.R233K	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg - Lys : peu important DG = 26	6	Hélice G	Liaison au substrat	Probably damaging 0	SV	15.04% / 8.1%	Notre équipe
Mutations	**intermédiaires**								
p.S301Y	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Ser - Tyr : très important DG = 144	7	Hélice I	Interactions électrostatiques	benign 0	NC ou SV	 56.9% / 57.2%	1) (Stikkelbroeck et al., 2003) 2) Notre équipe
p.R369W	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg -Trp : important DG = 101	8	Boucle	Proche du site d'oxydoréduction	Probably damaging 0	NC ou SV	45.8% / 48.5%	Notre équipe
Mutations	**modérées**								
p.H38L	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	His – Leu : important DG = 99	1	boucle	Ancrage membrane	Possibly damaging 0.1	NC	18.5% / 17.9%	Notre équipe
p.H62L	Espèces: (+) Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	His - Leu : important DG = 99	1	Feuillet β1-1	Ancrage membrane	Probably damaging 0.3	NC	 29.2% / 66.5% 4.1% / 2.3%	1) (Pinto et al., 2003) 2)(Menassa et al., 2008) 3)(Soardi et al., 2008)
p.G178R	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Gly -Arg : important DG = 125	4	Boucle	Position hélice I (site actif)	Probably damaging 0	NC	0.4% / 0% 41.98% / 43.6%	1) (Grischuk et al., 2006) 2) Notre équipe
p.I230T	Espèces: - Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : -	Ile - Thr : important DG = 89	6	Hélice G	Liaison indirecte au substrat	benign 0.1	NC	63.1% / 70.6%	Notre équipe
p.V304M	Espèces: + Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : (+)	Val - Met : peu important DG = 21	7	Hélice I	Proche site actif	benign 0	NC	46% / 26%	(Lajic et al., 2002)
p.R339H	Espèces: (+) Mammifères (+) Stéroïdogenèse : -	Arg - His : peu important DG = 29	8	Hélice J'	Oxydo-réduction	Probably damaging 0	NC	49.2% / 19.8%	(Helmberg et al., 1992)
p.A391T	Espèces:+ Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : -	Ala - Thr : peu important DG = 58	9	Hélice K'	Pas de rôle connu	benign 0.3	NC	38% / 23%	(Robins et al., 2007)
p.P482S	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Pro – Ser : important DG = 74	10	Boucle	Pas de rôle connu	Probably damaging 0.1	NC	70% / 72%	(Balsamo et al., 2000) (Barbaro et al., 2004)
Polymorphismes									
p.M239K	Espèces: - Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Met - Lys : important DG = 95	6	Boucle	Pas de rôle connu	Benign 1	Normal	95.4% / 97.7%	(Robins et al., 2005)
p.Y259H	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Tyr - His : important DG = 83	7	Hélice H	Pas de rôle connu	Possibly damaging 0.1	Normal	90.5% / 97.6%	Notre équipe
p.A265V	Espèces: - Mammifères : - Stéroïdogenèse : (+)	Ala - Val : peu important DG = 64	7	Hélice H	Pas de rôle connu	Benign 0.3	Normal	92% / 100%	(Bleicken et al., 2008)

Conservation des résidus: « + » : très conservé, « (+) » : moyennement conservé, « - » faiblement conservé.
Logiciel de prédiction : La valeur numérique donnée par SIFT est soulignée si la substitution est prédite sévère.Un score inférieur à 0.1 indique l'absence d'alignement de l'AA donc le caractère peu fiable de la prédiction.

3.2. Etude *in silico* des mutations dont la sévérité a été déduite du phénotype

L'analyse approfondie du phénotype de nos patients nous a permis de déduire la sévérité de 29 mutations rares avant de les étudier *in vitro* (tableau 29). Deux groupes ont ainsi été distingués : le groupe 1 comportant les mutations sévères et le groupe 2 les mutations modérées. En nous basant sur les informations obtenues de l'analyse *in silico* des mutations étudiées *in vitro*, nous avons de la même façon utilisé notre modèle pour déterminer le retentissement des mutations dont la sévérité avait été déduite du seul phénotype des patients.

3.2.1 Groupe 1 : Mutations sévères

Parmi les 19 mutations déclarées sévères d'après le phénotype, 4 ont été étudiées *in vitro* au laboratoire donc 15 restaient à étudier *in silico*. Certaines sont dans les domaines fonctionnels de la protéine qui ont été détaillés précédemment, d'autres touchent le site d'initiation de la traduction ou le domaine d'ancrage à la membrane ; enfin deux substitutions affectant une proline semblent avoir une répercussion sévère en dépit de leur localisation dans un domaine peu important (mutations p.L342P et p.R444P).

Les mutations situées dans des domaines fonctionnels sont dans le tableau 28 :

TABLEAU 28 : Mutations touchant des domaines importants pour la fonction

Site d'initiation de la traduction	Ancrage à la membrane	ERR triade	domaine de liaison à l'hème	Site actif	Stabilité de la protéine
p.M1V	p.Y59N	p.R354C	p.W116R	p.A285E	p.R483W
p.M1L		p.R354P	p.H365Y		
p.M1T			p.P386R		
			p.N387I		
			p.F421L		

a) Site d'initiation à la traduction

Trois mutations différentes affectant la 1ère méthionine ont été identifiées, toutes responsable d'un phénotype sévère. Le premier codon ATG rencontré en phase dans la séquence du gène est en position 81 ; il y a donc perte de toute la partie N-terminale de la protéine en amont, notamment les résidus hydrophobes nécessaires à l'ancrage de la protéine dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse.

b) Ancrage à la membrane

Contrairement aux autres mutations identifiées au niveau des patchs hydrophobes et conclues modérées (p.H38L et p.H62L), la mutation p.Y59N paraît sévère d'après le phénotype. La classe de ce résidu, situé dans le deuxième patch hydrophobe, est strictement conservée entre les différentes familles de cytochromes P450s. Par ailleurs, la substitution d'une tyrosine hydrophobe avec un noyau aromatique par une asparagine polaire à chaîne latérale aliphatique pourrait perturber l'ancrage à la membrane d'une façon plus sévère qu'une substitution d'une histidine en une leucine.

c) Triade « ERR »

Deux mutations affectent un résidu décrit dans le chapitre précédent, il s'agit des mutations p.R354C et p.R354P. Comme expliqué pour la p.R354H, en cas de perte de cette arginine strictement conservée, il y a perte d'interactions avec les résidus E351 et E403 essentiels pour le maintien de la structure tridimensionnelle du cytochrome CYP21.

d) Domaine de liaison à l'hème

Cinq mutations ont été identifiées : p.W116R, p.H365Y, p.P386R, p.N387I, p.F421L.

Les résidus W116 et H365 sont connus comme impliqués dans la coordination aux propionates ; le tryptophane 116 est strictement conservé au sein des différents cytochromes (décalage d'un seul acide aminé au niveau des cytochromes stéroïdogéniques) et on comprend que son remplacement par une arginine abolisse l'activité enzymatique. L'histidine 365, dont la classe est strictement conservée au sein des différents cytochromes, est située à proximité de l'hème (<5Å) et la substitution d'une histidine basique par une tyrosine hydrophobe pourrait expliquer la répercussion sévère.

La prolines 386 et l'asparagine 387 sont très conservées au niveau des espèces et elles sont situées dans le domaine de liaison à l'hème. Pour chacune des mutations les affectant, l'écart physico-chimique entre les deux acides aminés est important.

Enfin la p.F421L touche un acide aminé strictement conservé au sein des différents cytochromes. C'est le premier résidu de la poche à cystéine dont le rôle est d'envelopper la cystéine dans un environnement hydrophobe. Ainsi son remplacement par une leucine doit perturber cet environnement hydrophobe puis le transfert d'électrons.

e) Site actif

L'alanine 285 se trouve au centre de l'hélice I, site actif de la protéine. Nous avons déjà expliqué la spécificité de ce domaine pour chaque cytochrome, la conservation des acides aminés n'étant donc pas le critère de sévérité mais c'est plutôt la classe de l'acide aminé qui importe. Si on analyse la classe de l'acide aminé à cette position, elle est conservée au sein des espèces (remplacée par une valine), mais moins au sein des autres cytochromes P450. Le changement d'une alanine hydrophobe en un acide glutamique polaire, pourrait avoir une répercussion sévère sur la fonction de la protéine.

f) Stabilité de la protéine

La mutation p.R483W a été conclue comme sévère, touchant le même résidu que les deux mutations p.R483P et p.R483Q décrites précédemment. Dans ce cas, l'arginine impliquée dans le repliement de la protéine est transformée en un tryptophane, ce qui doit être tout aussi délétère qu'en cas de proline ou glutamine.

g) Mutations sévères situées dans un domaine peu important

Il s'agit des p.L342P et p.R444P qui touchent deux résidus moyennement conservés au sein des cytochromes. Ils sont situés dans des régions peu explorées à ce jour. Nous pouvons simplement conclure que l'écart physico-chimique entre les deux acides aminés étant important pour chacune de ces mutations et que l'apparition d'une proline est connue pour casser les hélices, ces mutations doivent perturber la fonction enzymatique.

3.2.2 Groupe 2 : Mutations modérées d'après le phénotype

Nous avons conclu au caractère modéré de 18 mutations d'après le phénotype des patients ; pour 3 d'entre elles, nous avons réalisé des études *in* vitro, restaient donc 15 mutations à analyser *in silico*. La répercussion modérée de ces mutations peut être expliquée soit parce qu'elles sont situées dans un domaine peu important pour l'activité 21-hydroxylase (à plus de 5 Å de l'hème et du substrat), soit parce qu'elles sont dans un domaine important mais avec des caractéristiques moins défavorables (faible conservation du résidu, écart-physico-chimique peu important). Nous avons tenté de discuter le retentissement de chacune des mutations modérées.

a) Mutation perturbant l'ancrage à la membrane : p. G35D

La glycine 35 est au niveau du premier patch hydrophobe et son remplacement par un acide aminé acide avec chaîne latérale, doit perturber l'ancrage à la membrane du réticulum endoplasmique, comme pour les mutations modérées p.P30L et p.H62L.

b) Mutation au niveau de la triade « ERR » : p.R408H

La différence de sévérité avec la p.R408C peut s'expliquer par le fait qu'arginine et histidine appartiennent à la même classe d'AA et ne diffèrent que par leurs chaînes latérales, aromatiques pour l'histidine et aliphatiques pour l'arginine. De plus au niveau des autres cytochromes P450s mammifères CYP2C5, CYP2B4, CYP2C8, CYP2C9, l'arginine est remplacée par une histidine.

c) Mutations appartenant à des domaines fonctionnels

C'est le cas des mutations p.S165F, p.I171S, pH203Y, p.D234E, p.Y336C et p.R435C.

Les résidus S165 et I171 sont situés au niveau de l'hélice E qui est en contact avec l'hélice I, contenant le site actif. La sérine 165 est très conservée au niveau des CYP21s des autres espèces mais moins dans les autres types de cytochromes. Elle est remplacée par une phénylalanine dans plusieurs cytochromes impliqués dans la stéroïdogenèse (CYP11B1, CYP11B2, CYP11A1, CYP17A1 et CYP19A1), ce qui peut expliquer le caractère modéré de la mutation. L'isoleucine 171 est très conservée au niveau des CYP21s mammifères, mais moins au sein des autres cytochromes. Elle est même remplacée par une sérine au niveau du CYP11A1. Une autre substitution de ce résidu, p.I171N, a été décrite comme sévère par Barbaro et al.,2006 (0.7 %, 0,6 % pour la conversion de la 17-OHP et P respectivement) et a été comparée à la mutation p.I172N associée à la forme virilisante pure. La différence de sévérité entre p.I171S et p.I171N peut éventuellement être expliquée par l'encombrement stérique moins important de la sérine par rapport à l'asparagine.

Les résidus H203 et D234 sont situés dans le domaine de liaison au substrat. Le remplacement de l'histidine 203 par une tyrosine de classe différente mais avec une longueur de chaîne latérale équivalente, permet d'expliquer son retentissement modéré. De même, le remplacement de l'acide aspartique 234 par un acide glutamique, entraîne un changement minime dans la chaîne latérale.

Les résidus Y336 et R435 sont situés dans le domaine de liaison aux partenaires d'oxydo-réduction ; la tyrosine 336 est dans l'hélice J' et l'écart physico-chimique avec une cystéine est très important ce qui peut expliquer le caractère pathogène de la mutation. Par contre, la conservation moyenne de l'acide aminé entre les différents types de cytochromes peut expliquer son caractère modéré. L'arginine 435 n'est pas très conservée au sein des différents cytochromes, ceci pourrait expliquer la répercussion peu sévère sur l'activité enzymatique.

d) Mutations affectant un résidu qui a une liaison indirecte aux domaines fonctionnels

Par définition, une liaison est dite indirecte entre un résidu et un domaine fonctionnel si la distance entre les deux est supérieure à 5 Å. Cinq mutations sont concernées, p.Y112C, p.I212T, p.M283V et p.L317M.

La tyrosine 112 est située au niveau de la boucle B'-C, à moins de 5 Å du deuxième site de reconnaissance au substrat SRS-2, des résidus impliqués dans l'oxydo-réduction (Ser 113, Lys117) et de la coordination aux propionates (Trp 116). Ainsi la substitution de la tyrosine par une cystéine qui peut établir un pont disulfure avec une autre cystéine, doit perturber la liaison au substrat et les interactions avec les partenaires d'oxydo-réduction.

L'isoleucine 212 est située dans une sphère de moins de 5Å du site de reconnaissance du substrat SRS-3, connu comme le « mouth of active site ». La classe de l'acide aminé est conservée à cette position pour les CYPs21 des autres espèces ainsi que les autres cytochromes mammifères mais moins au niveau des cytochromes impliqués dans la stéroïdogenèse ; l'écart physico-chimique entre isoleucine et thréonine est important.

La méthionine 283 est située en N-terminal de l'hélice I, l'écart physico-chimique est peu important entre les deux acides aminés, méthionine et valine, expliquant un retentissement modéré de la mutation.

La Leucine 317 correspond au résidu Valine 323 du CYP2C8 ; ce dernier appartient à un large amas hydrophobe très conservé au niveau des cytochromes P450s et situé dans une région charnière entre les hélices I et J. Cet amas hydrophobe est situé à proximité de la poche de liaison de l'hème avec des acides aminés très denses. Ainsi n'importe quel changement dans le volume des acides aminés provoquerait des changements structuraux au sein de la poche de liaison en perturbant la position de l'acide aminé par rapport à ces voisins et la localisation des hélices les unes par rapport aux autres.

e) Mutation affectant le domaine C-terminal : p.P475L

Ce domaine est peu exploré. La mutation p.P475L doit être modérée d'après le phénotype de la patiente chez laquelle nous l'avons identifiée et qui porte une mutation sévère sur l'autre allèle. Ce résidu est conservé entre les espèces mais moins au sein des autres cytochromes P450 et le remplacement d'une proline essentielle pour la structure protéique par un acide aminé avec une chaîne latérale, ce au niveau de la partie C-terminale, doit perturber le repliement et l'activité de la protéine.

f) Mutations affectant la flexibilité de la protéine : p.P92H et p.P92T

La proline 92 est conservée au niveau des CYP21s des autres espèces mais moins au sein des autres cytochromes. Les différents modèles des CYP21s montrent que la proline 92 est localisée au niveau de la boucle BB'. Cette boucle participerait grâce à sa flexibilité à l'accès du substrat au niveau du premier site de reconnaissance du substrat (SRS-1). Cette flexibilité est assurée par deux motifs GXG très conservés au niveau des différents cytochromes, au niveau du CYP21 ce sont les motifs G90XP92 et G110XY112. Ainsi le remplacement de la proline 92 par une histidine ou une thréonine avec chaîne latérale, doit perturber l'accès du substrat par perte de cette flexibilité.

TABLEAU 29 : Etude *in silico* des mutations dont la sévérité est déduite du phénotype

Mutation	Conservation AA	Changement d'AA 1-Ecart physico-chimique 2-Distance de Grantham [0-215]	Gène (exon)	Protéine Structure secondaire	Rôle de l'AA dans la fonction protéique	Logiciels de prédiction Polyphen SIFT	Phénotype
Mutations	**sévères**						
p.M1V	-	-	1	Non modélisée	Initiation de la traduction	benign 0	SW
p.M1L	-	-	1	Non modélisée	Initiation de la traduction	benign 0	SW/SV
p.M1T	-	-	1	Non modélisée	Initiation de la traduction	benign 0	SW
p.Y59N	Espèces : + Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : (+)	Tyr - Asn : très important DG = 143	1	Feuillet β1-1	Ancrage à la membrane	Probably damaging 0	SW/SV
p.W116R	Espèces : + Mammifères : + Stéroïdogenèse : -	Trp - Arg : important DG = 101	3	Hélice C	Coordination propionates	Probably damaging 0	SW/SV
p.A285E	Espèces : (+) Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Ala - Glu : important DG = 107	7	Hélice I	Site actif	benign 0	SW/SV
p.L342P	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : (+)	Leu – Pro : important DG = 98	8	Hélice K	Pas de rôle connu	Probably damaging 0	SW/SV
p.R354C	Espèces : + Mammifères : + Stéroïdogenèse : +	Arg - Cys : très important DG = 180	8	Boucle	ERR triade	Probably damaging 0	SW
p.R354P	Espèces : + Mammifères : + Stéroïdogenèse : +	Arg - Pro : important DG = 103	8	Boucle	ERR triade	Probably damaging 0	SW
p.H365Y	Espèces : + Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : (+)	His - Tyr : important DG = 83	8	Boucle	Liaison à l'hème	Probably damaging 0	SW
p.P386R	Espèces :+ Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Pro - Arg important DG = 103	9	Feuillet β1-3	Proximité à l'hème	Probably damaging 0	SW/SV
p.N387I	Espèces :+ Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Asn - Ile : très important DG = 149	9	Feuillet β1-3	Proximité à l'hème	Probably damaging 0	SW
p.F421L	Espèces :+ Mammifères : + Stéroïdogenèse : +	Phe et Leu peu important DG = 22	10	Boucle	Poche à cystéine	Probably damaging 0	SW/SV
p.R444P	Espèces : - Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg et Pro important DG = 103	10	Hélice L	Pas de rôle connu	benign 0.1	SW/SV
p.R483W	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg et Trp important DG = 101	10	Boucle	Stabilité protéine	Probably damaging 0	SW/SV

Mutations	**modérées**						
p.G35D	Espèces : + Mammifères : + Stéroïdogenèse : -	Gly et Asp important DG = 94	1	boucle	Ancrage à la membrane	Benign 0.1	NC
p.P92T	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Pro et Thr peu important DG = 38	2	Boucle	Accès au substrat	Probably damaging 0	NC
p.P92H	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse: -	Pro et His important DG = 77	2	Boucle	Flexibilité	Probably damaging 0	NC
p.Y112C	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Tyr et Cys très important DG = 194	3	Boucle	Liaison au substrat Oxydo-réduction	Probably damaging 0	NC
p.S165F	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Ser et Phe très important DG = 155	4	Hélice E	Contact avec hélice I (site actif)	Benign 0	NC
p.I171S	Espèces : + Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : -	Ile et Ser très important DG = 142	4	Hélice E	Contact avec hélice I (site actif)	Probably damaging 0	NC
p.H203Y	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	His et Tyr important DG = 83	5	Boucle	Liaison au substrat	Possibly damaging 0.1	NC
p.I212T	Espèces : (+) Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Ile et Thr important DG = 89	5	Boucle	Liaison indirecte au substrat (> 5 Å)	Possibly damaging 0	NC
p.D234E	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : (+)	Asp et Glu peu important DG = 45	6	Hélice G	Accès du substrat	Possibly damaging 0	NC
p.M283V	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Met et Val peu important DG = 21	7	Hélice I	Pas de rôle connu	Probably damaging 0	NC
p.L317M	Espèces : + Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : +	Leu et Met peu important DG = 15	8	Hélice J	Pas de rôle connu	Benign 0.03	NC
p.Y336C	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Tyr et Cys très important DG = 194	8	Boucle	Oxydo-réduction	Probably damaging 0	NC
p.R408H	Espèces :+ Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : (+)	Arg et His peu important DG = 29	10	Hélice K''	ERR triade	Benign 0	NC
p.R435C	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg et Cys très important DG = 180	10	Hélice L	Oxydo-réduction	Probably damaging 0	NC
p.P475L	Espèces : + Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : -	Pro et Leu important DG = 98	10	Boucle	Pas de rôle connu	Probably damaging 0	NC

Conservation des résidus: « + » : très conservé, « (+) » : moyennement conservé, « - » faiblement conservé.
Logiciel de prédiction : La valeur numérique donnée par SIFT est soulignée si la substitution est prédite sévère.Un score inférieur à 0.1 indique l'absence d'alignement de l'AA donc le caractère peu fiable de la prédiction.

3.3. Mutation dont la sévérité est prédite par les seules études *in silico*

Elles sont au nombre de 26 (tableau 31). Nous nous sommes appuyés sur les conclusions tirées des deux groupes précédents pour tenter de déterminer leur sévérité de l'analyse *in silico*. Comme précédemment, nous les avons classées en 3 groupes : sévères, modérées et polymorphismes.

3.3.1. Groupe 1 : Mutations sévères

Toutes les mutations situées dans des domaines fonctionnels et avec des écarts-physico-chimiques importants ont été prédites comme sévères. Elles sont présentées dans le tableau 30.

TABLEAU 30 : Mutations prédites sévères

Domaine de liason à l'hème	Oxydo-réduction	Substitution par une proline
p.L288H	p.R124C p.R132C p.R339C	p.L461P

a) Mutations situées dans le domaine de liaison à l'hème

Il s'agit de la mutation p.L288H. La leucine 288 est localisée dans une région très proche du site actif de la protéine (distance < 5Å des résidus 284-293 du domaine de liaison à l'hème et du domaine de liaison au substrat). La classe est très conservée au sein des différents cytochromes, la leucine est hydrophobe et l'histidine basique ; ces différentes données sont en faveur du caractère sévère de cette mutation.

b) Mutations situées dans le domaine de liaison aux partenaires d'oxydo-réduction

Trois mutations sont concernées : p.R124C, pR132C et p.R339C. Ces 3 arginines paraissent impliquées dans les échanges électrostatiques qui sont importantes pour la réaction de catalyse. La substitution par une cystéine doit avoir une répercussion sévère.

c) Mutation affectant le domaine C-terminal : p.L461P

La leucine 461, située dans la partie C-terminale, doit participer au repliement de la protéine et l'apparition d'une proline qui casse l'hélice doit l'en empêcher.

3.3.2. Groupe 2 : Mutations modérées

a) Mutations affectant le même résidu que des mutations décrites dans les 2 premiers paragraphes : p.G35A, p.H38Y, p.V281M, p.R341W

Mutation p.G35A : la mutation p.G35D a été conclue modérée. Le changement en une alanine doit être encore moins délétère puisque cet acide aminé est hydrophobe donc il peut également permettre l'ancrage à la membrane ; par contre, l'alanine étant plus encombrante qu'une glycine, cet ancrage n'est peut-être pas parfait, ce qui expliquerait que ce ne soit pas un polymorphisme.

Mutation p.H38Y : la mutation p.H38L est une mutation modérée, la substitution de l'histidine en une tyrosine également hydrophobe, ne doit pas être plus sévère. Comme pour la p.H38L, elle doit augmenter l'immersion de la protéine dans la membrane.

Mutation p.V281M : Deux mutations au niveau du même codon sont déjà décrites dans la littérature, la mutation fréquente modérée p.V281L et la mutation rare sévère p.V281G. La valine 281 est localisée au niveau du premier tour de l'hélice I, site actif de la protéine. Ce résidu est très conservé au sein des CYP21s des espèces et remplacé par un autre acide aminé de même classe, leucine ou isoleucine, dans les autres cytochromes. Des études de stabilité ont été réalisées pour le mutant p.V281G montrant que ce résidu aurait plus un rôle dans la fonction de l'enzyme que dans sa stabilité, la demi-vie du mutant p.V281G étant quasi-normale ; ainsi, la valine pourrait être un des résidus formant la poche de liaison au substrat.

Les études de mutagenèse dirigée ont montré que le remplacement de la valine par d'autres acides aminés, leucine, isoleucine, thréonine n'avait pas la même sévérité : le mutant p.V281I est le moins sévère (60-70 %) puis p.V281L (20-50 %) et p.V281T (15 %). De plus, la quantité d'hème calculée d'après l'absorbance à 450 nm, est plus faible pour la p.V281L que pour la p.V281I alors qu'aucune hémoprotéine n'est détectée pour la p.V281T (Wu and Chung, 1991).

Concernant la p.V281M, l'écart physico-chimique entre les deux acides aminés est comme pour la p.V281L peu important ce qui peut expliquer que cette nouvelle mutation ne soit pas sévère.

Mutation p.R341W : la mutation R341P est connue comme sévère. La sévérité de la p.R341W est sujet à discussion car nous l'avons trouvée dans les deux formes cliniques (sévère et modérée). La différence de sévérité entre p.R341P et p.R341W peut s'expliquer par la capacité de la proline à casser les hélices, ce qui n'est pas le cas du tryptophane.

b) Mutation perturbant l'ancrage à la membrane : p.P42H

La proline P42 est située au niveau du premier patch hydrophobe et sa substitution par une histidine basique doit perturber l'ancrage à la membrane.

c) Mutations affectant un résidu qui a une liaison indirecte aux domaines fonctionnels : p.R75K, p.S202G, p.R366H, p.V358I, p.S113A et p.S113Y, p.M260V, p.F306V, p.H310N

L'arginine 75 est située au niveau de l'hélice B qui est impliquée dans l'entrée du substrat tandis que la sérine 202 est située à proximité du troisième site de reconnaissance du substrat. Pour les deux mutations, l'écart physico-chimique est peu important, il est donc probable que ces substitutions ne soient pas sévères.

L'arginine 366 est à proximité du substrat, c'est un AA moyennement conservé et l'écart physico-chimique avec l'histidine est peu important ; il est probable que cette mutation ne soit pas sévère malgré sa localisation.

La valine 358 est moyennement conservée entre les cytochromes mammifères et ceux de la stéroïdogenèse, elle est même remplacée par une isoleucine dans l'aromatase et le cytochrome CYP3A4. L'écart physico-chimique entre valine et isoleucine est peu important. Bien qu'elle soit située dans le domaine de liaison à l'hème et au substrat, il est probable que cette mutation ne soit pas sévère.

Deux mutations affectent des résidus avec une liaison indirecte au partenaire d'oxydo-réduction : p.S113A et p.S113Y. Le changement de la sérine 113, moyennement conservée au sein des cytochromes, pourrait altérer la fonction enzymatique en modifiant les liaisons hydrogènes avec la lysine 117 impliquée dans la réaction d'oxydo-réduction.

Les mutations p.M260V, p.F306V, p.H310N touchent un AA avec une liaison indirecte au site actif. La méthionine 260 est située au niveau de l'hélice H dans une sphère < 5 Å par rapport aux AA de l'hélice I, siège de la catalyse. L'écart physico-chimique entre méthionine et valine est peu important. Ainsi la p.M260V pourrait perturber les interactions au niveau du site actif et diminuer modérément l'activité enzymatique.

La phénylalanine 306 est située au bout de l'hélice I qui forme une partie de la poche de liaison au substrat et à l'hème ; elle est conservée au niveau des espèces sauf chez le porc où elle est remplacée par une tyrosine mais moins au sein des autres cytochromes. Le changement en une valine pourrait donc perturber la liaison du substrat au site actif.

Enfin, l'histidine 310 est à la fin de l'hélice I ; ce résidu est faiblement conservé au sein des cytochromes et l'écart physico-chimique entre les deux acides aminés est peu important.

d) Mutations dans un domaine peu connu : p.Y47C, p.R149H, p.L198F, p.V249A et p.G455R

La tyrosine 47 est située dans une partie faiblement conservée. L'écart physico-chimique entre tyrosine et cystéine est très important. Il est donc probable que cette mutation altère la fonction enzymatique tout en gardant une certaine activité.

L'arginine 149 est située dans l'hélice D peu connue ; l'écart physico-chimique avec l'histidine est faible. Il est difficile de trancher entre mutation modérée et polymorphisme pour cette variation trouvée associée sur le même allèle à la mutation modérée p.P453S chez un patient atteint de forme intermédiaire non classique-virilisante pure.

La leucine 198 est située dans la partie C-terminale de l'hélice F, loin des domaines importants de la protéine. Elle est faiblement conservée au sein des cytochromes, remplacée par une phénylalanine au niveau du CYP2B4 et CYP2C8. De plus l'écart physico-chimique entre les deux acides aminés est peu important, argument en faveur de son caractère modéré.

La Valine 249 est située dans la boucle entre les hélices G'' et H, dans une région peu impliquée dans la fonction. C'est un AA conservé entre les espèces mais peu entre les types de cytochromes. L'écart physico-chimique entre valine et alanine est peu important.

La Glycine 455 est située dans la partie C-terminale, dans une région peu importante pour la fonction de la protéine ; elle est faiblement conservée au sein des cytochromes.

3.3.3. Simples polymorphismes : p.N220S et p.S482G

L'asparagine 220 est située au début de l'hélice G qui est impliquée dans l'accès du substrat de la surface au site actif. L'écart physico-chimique entre asparagine et sérine est peu important étant donné qu'elles appartiennent à la même classe et l'asparagine est remplacée par une sérine au niveau de plusieurs cytochromes. Il est ainsi probable que cette variation de séquence soit un simple polymorphisme.

Concernant la sérine 482, elle est située dans un domaine peu exploré et peu conservé, elle est par ailleurs remplacée par une glycine dans les cytochromes d'autres espèces.

Ainsi, l'analyse détaillée de toutes ces mutations pour lesquelles nous n'avions aucun autre moyen que la modélisation pour prédire leur sévérité, souligne les difficultés à trancher entre mutation sévère ou modérée, mutation modérée et simple polymorphisme. Même avec une connaissance poussée des domaines impliqués dans la fonction enzymatique, nous ne pouvons pas formellement trancher sur la conséquence de toutes ces mutations, excepté celles situés dans des domaines fonctionnels évidents.

TABLEAU 31: Mutations dont la sévérité est déduite des seules études *in silico*

Protéine	Conservation AA	Changement d'AA 1-Ecart physico-chimique 2-Distance de Grantham [0-215]	Gène (exon)	Protéine Structure secondaire	Rôle de l'AA dans la fonction protéique	Logiciels de prédiction Polyphen SIFT	Prédiction
Mutations	**sévères**						
p.R124C	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg et Cys très important DG = 180	3	Hélice C	Oxydo-réduction	Possibly damaging 0	SV/SW
p.R132C	Espèces: + Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : -	Arg et Cys très important DG = 180	3	Boucle	Oxydo-réduction	Probably damaging 0	SV/SW
p.L288H	Espèces: + Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : (+)	Leu et His important DG = 99	7	Hélice I	Proche de l'hème	Probably damaging 0	SV/SW
p.R339C	Espèces: (+) Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : -	Arg et Cys très important DG = 180	8	Hélice J'	Oxydo-réduction	Probably damaging 0	SV/SW
p.L461P	Espèces:+ Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : -	Leu et Pro important DG = 98	10	Boucle	Proline casse une hélice	Probably damaging 0	SV/W
Mutations	**modérées**						
p.G35A	Espèces: + Mammifères: + Stéroïdogenèse: -	Gly et Ala peu important DG = 60	1	Boucle	Perturbation de l'ancrage à la membrane	Benign 0.9	NC
p.H38Y	Espèces: + Mammifères: - Stéroïdogenèse: -	His et Tyr important DG = 83	1	Boucle	Perturbation de l'ancrage à la membrane	Probably damaging 0.1	NC
p.P42H	Espèces: + Mammifères: - Stéroïdogenèse: -	Pro et His important DG = 77	1	Boucle	Perturbation de l'ancrage à la membrane	Possibly damaging 0	NC
p.Y47C	Espèces: - Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Tyr et Cys très important DG = 194	1	Hélice A	Proximité des patchs responsables de la liaison à la membrane	Possibly damaging 0.1	NC
p.R75K	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg et Lys peu important DG = 26	2	Hélice B	Proximité de la boucle B'-C impliquée dans la liaison au substrat	Benign 0.4	NC
p.S113A	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Ser et Ala important DG = 99	3	Boucle	Proximité de la région impliquée dans l'oxydo-réduction	Possibly damaging 0.1	NC
p.S113Y	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Ser et Tyr très important DG = 144	3	Boucle	Proximité de la région impliquée dans l'oxydo-réduction	Probably damaging 0	NC
p.R149H	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg et His peu important DG = 29	4	Hélice D	-	Possibly damaging 0	NC
p.L198F	Espèces: (+) Mammifères :-	Leu et Phe peu important	5	Boucle	Loin des domaines importants	Benign	NC

	Stéroïdogenèse : (+)	DG = 22				0	
p.S202G	Espèces: - Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Ser et Gly peu important DG = 56	5	Boucle	Liaison indirecte avec le substrat	Benign 0.4	NC
p.V249A	Espèces: + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Val et Ala peu important DG = 64	7	Boucle	Loin des domaines importants	Benign 1	NC
p.M260V	Espèces : + Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Met et Val peu important DG = 21	7	Hélice H	Liaison indirecte avec le site actif	Probably damaging 0	NC
p.V281M	Espèces: + Mammifères : (+) Stéroïdogenèse (+)	Val et Met peu important DG = 21	7	Hélice I	Proche du site actif	Benign 0.13	NC
p.F306V	Espèces : (+) Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Phe et Val peu important DG = 50	7	Hélice I	Liaison indirecte avec le site actif	Possibly damaging 0	NC
p.H310N	Espèces: + Mammifères : (+) Stéroïdogenès : -	His et Asn peu important DG = 68	7	Hélice I	Hélice I , site actif	Possibly damaging 0.1	NC
p.R341W	Espèces: - Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg et Trp important DG = 101	8	Hélice J’	Oxydo-réduction	Probably damaging 0	NC ?
p.V358I	Espèces: + Mammifères : (+) Stéroïdogenèse : (+)	Val et Ile peu important DG = 29	8	Boucle	Proche de l’hème et du substrat mais écart physico-chimique peu important entre les deux résidus	Benign 0	NC
p.R366H	Espèces: (+) Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Arg et His peu important DG = 29	8	Boucle	Domaine impliqué dans la sortie des produits	Possibly damaging 0.1	NC
p.G455R	Espèces: - Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Gly et Arg important DG =125	10	Hélice L’	Partie C-terminale impliquée dans le repliement de la protéine, remplacement d’une glycine, résidu le plus petit	Possibly damaging 0.2	NC
Polymorphismes							
p.N220S	Espèces: - Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Asn et Ser peu important DG = 46	6	Hélice G	Simple polymorphisme	Benign 0	Normal
p.S468G	Espèces: - Mammifères : - Stéroïdogenèse : -	Ser et Gly peu important DG = 56	10	Boucle	Simple polymorphisme	Benign 1	Normal

Conservation des résidus: « + » : très conservé, « (+) » : moyennement conservé, « - » faiblement conservé.
Logiciel de prédiction : La valeur numérique donnée par SIFT est soulignée si la substitution est prédite sévère. Un score inférieur à 0.1 indique l’absence d’alignement de l’AA donc le caractère peu fiable de la prédiction.

Nous avons fait une synthèse de l'étude *in silico* des 85 mutations rares (figure 49-50).

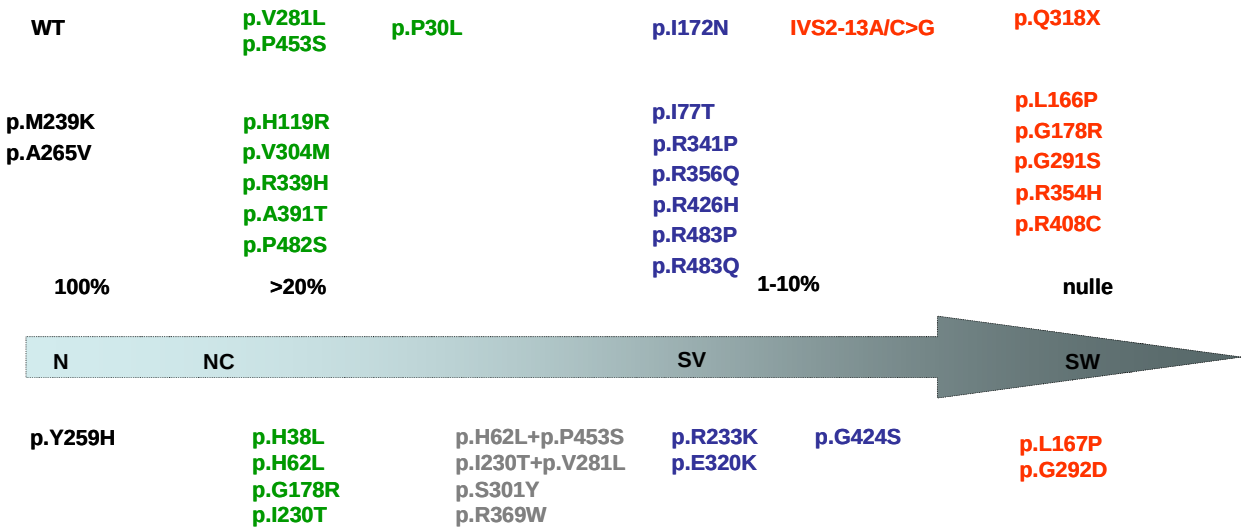


FIGURE 49 : Mutations étudiées *in vitro* par d'autres équipes (au-dessus de la flèche), dans notre laboratoire (au-dessous de la flèche) ; la p.G178R a été étudiée par deux équipes dont la nôtre.

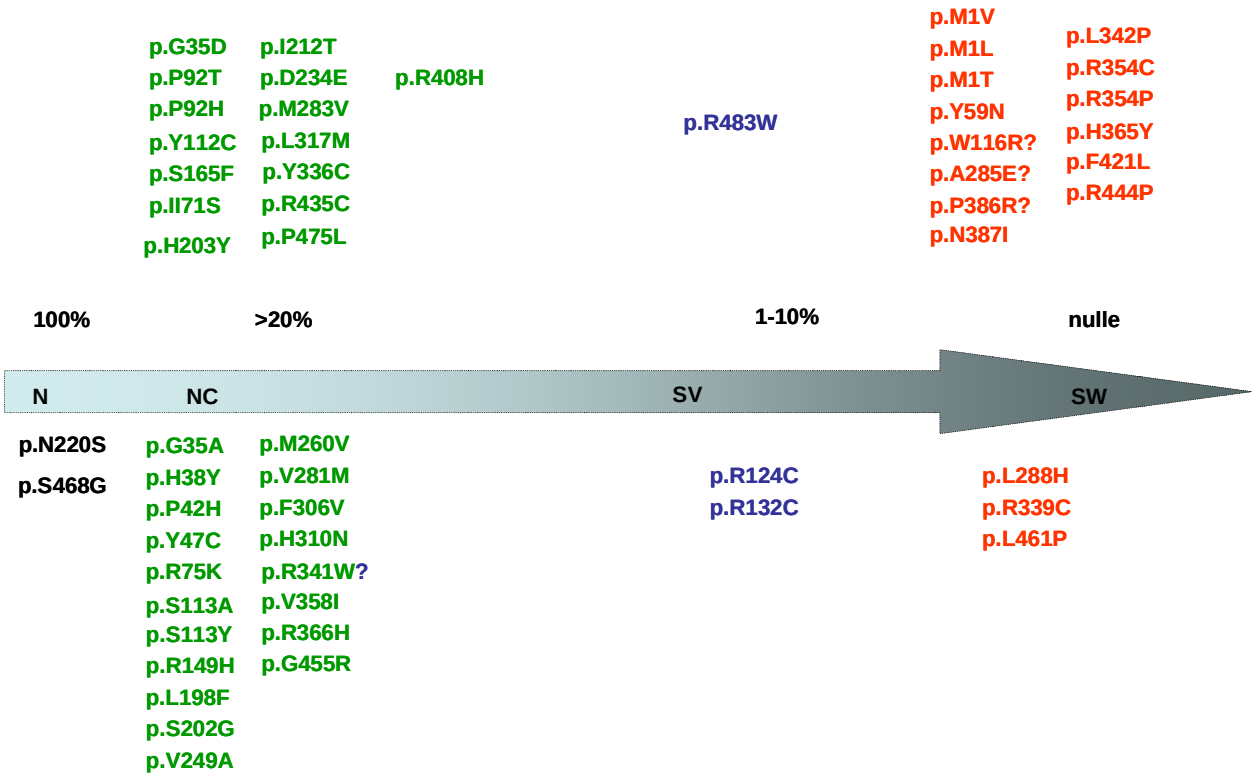


FIGURE 50 : Mutations étudiées *in silico* dont la sévérité a été déduite du phénotype (au-dessus de la flèche) ou des seules études *in silico* (au-dessous de la flèche).

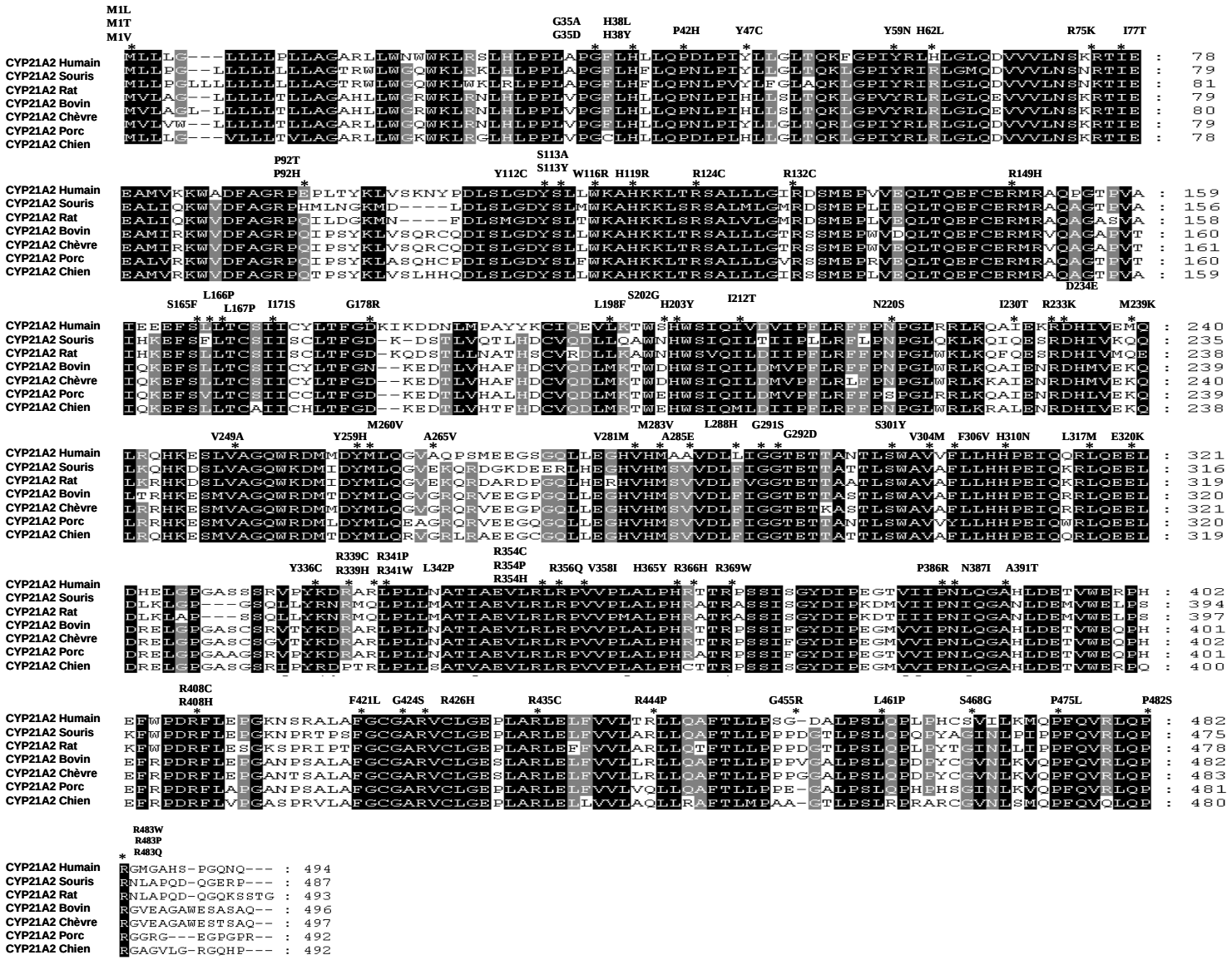


FIGURE 51 : Alignement de séquence primaire d'acides aminés de plusieurs espèces du cytochrome CYP21.

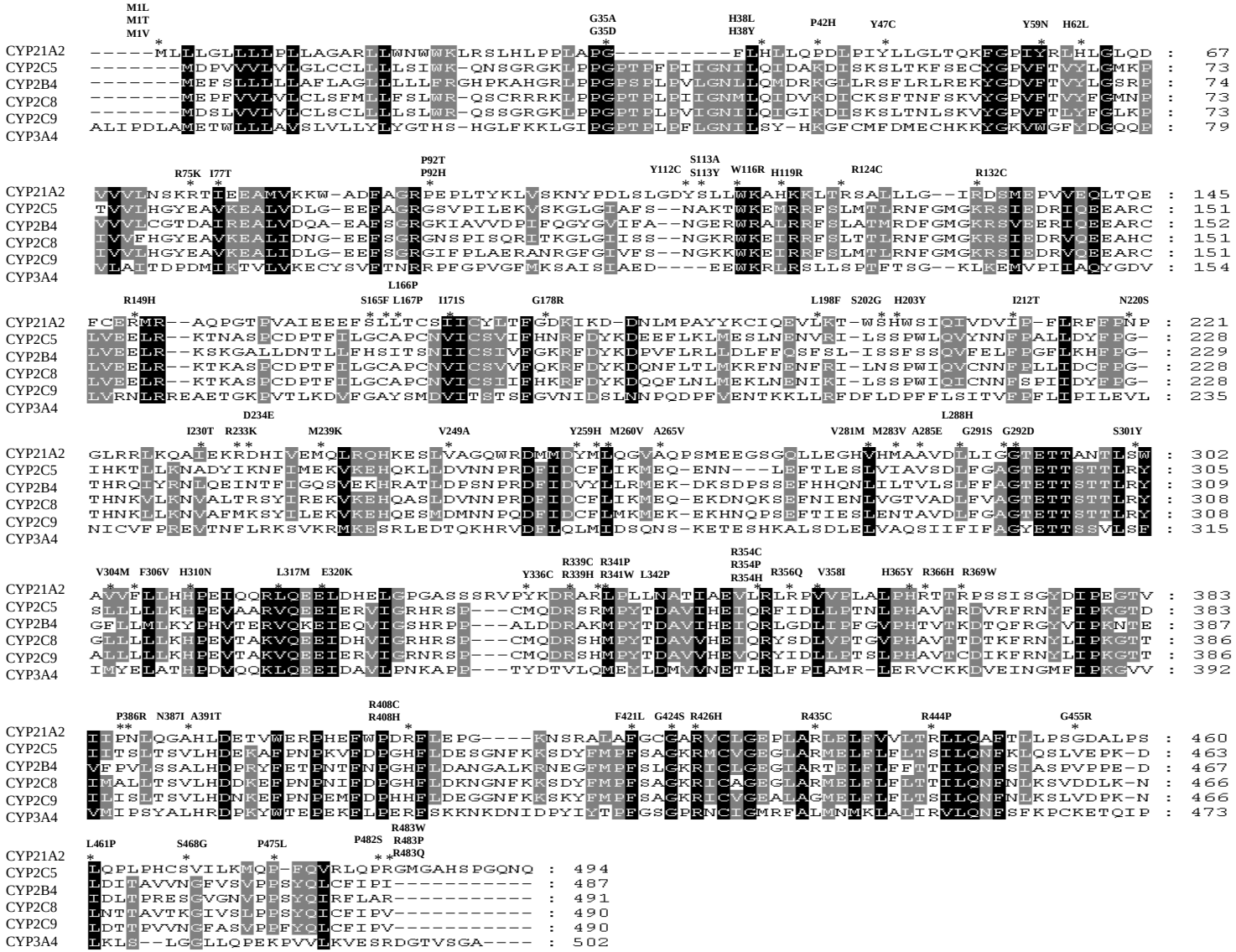


FIGURE 52 : Alignement de séquence d'acides aminés primaires de différents cytochromes mammifères.

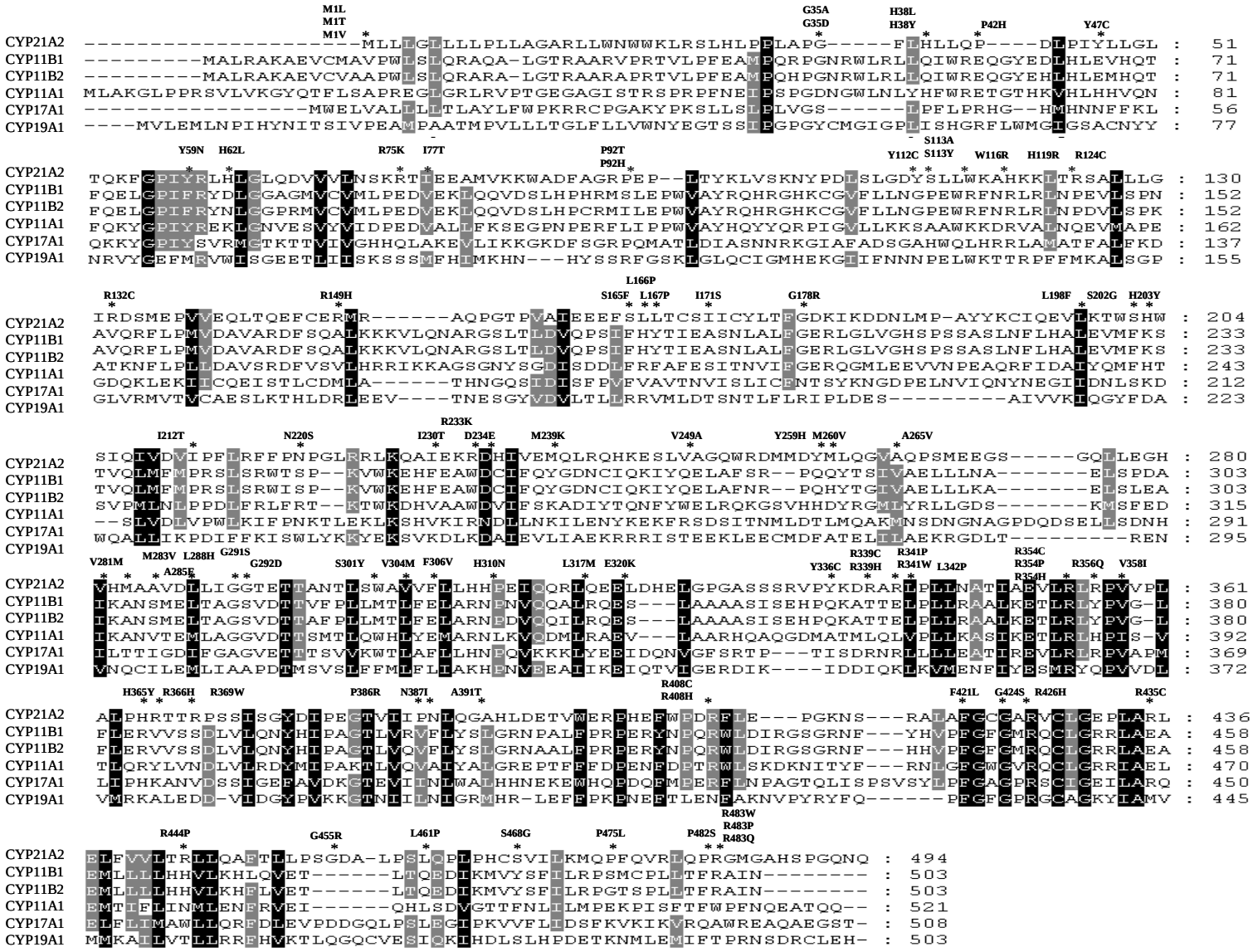


FIGURE 53 : Alignement de séquence d'acides aminés primaires de différents cytochromes de la stéroïdogénèse.

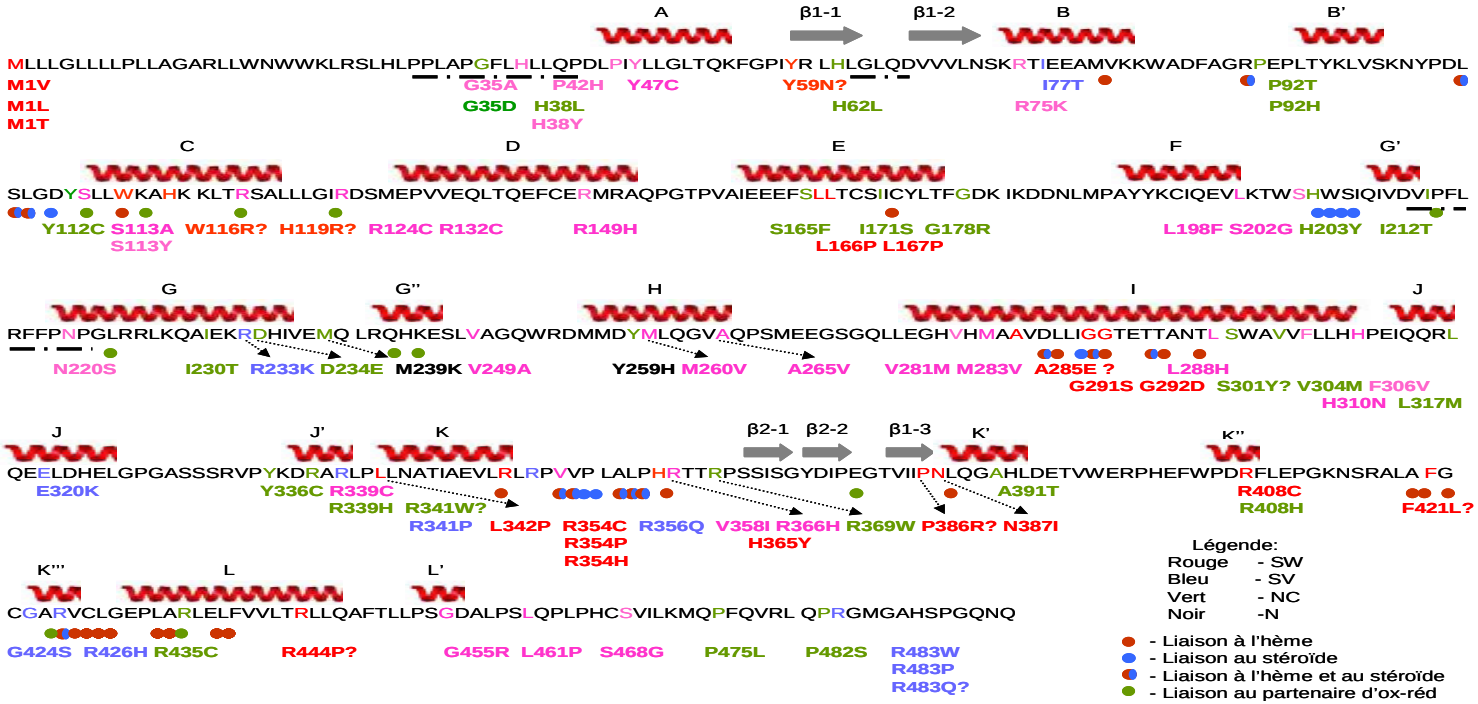


FIGURE 54 : Séquence primaire du CYP21 et ses domaines importants.

V. Traitement structure-fonction

Depuis plusieurs années, la modélisation par homologie est devenue un outil important pour l'étude structurale et fonctionnelle des cytochromes P450s, en complément des approches expérimentales comme la mutagenèse dirigée. Plusieurs formes de P450 présentent une large spécificité de substrats, mais les isoformes individuelles ont souvent une régio- et stéréospécificité pour un composé particulier. L'élucidation de la structure basique pour une telle spécificité est d'une grande importance dans la compréhension de la fonction enzymatique et du mécanisme. Outre la compréhension du fonctionnement, cette approche permet de prédire la sévérité d'une mutation suivant sa localisation dans le cytochrome ; la sévérité de chaque mutation est bien corrélée à la forme clinique, offrant une information valable sur les résidus importants pour la fonction de la protéine (Szklarz et al., 2000).

Les résidus clés sont définis de telle sorte qu'après substitution, l'activité de l'enzyme est altérée. Ainsi par exemple, dans le système P4502A4/2A5, la substitution dans la position 209, F209L, convertit l'hydroxylation de la coumarine caractéristique du 2A5 en hydroxylation de la testostérone caractéristique du 2A4 (Lindberg and Negishi, 1989). La modélisation de ce cytochrome P450 2A4 basée sur la structure du CYP101 montre que ce résidu interagit avec le substrat et détermine la spécificité.

En dépit d'une petite identité de séquences, l'architecture générale de la superfamille des cytochromes est conservée, en plus de plusieurs motifs nécessaires pour la stabilité de la structure. La substitution d'un acide aminé par un autre au niveau de ces motifs a une répercussion grave au niveau de l'activité enzymatique.

Les motifs structuraux sont les suivants :

- W(R/K)XXR au sein de l'hélice C
- EXXR au sein de l'hélice K
- (W/F)XXPXX(F/Y)XPX(H/R)(W/F) dans la région « meander »
- XXF(G/S)XGX(H/R)XCXGXX(L/F)AXXE avant l'hélice L contenant le résidu cystéine avec lequel l'hème vient se lier au cytochrome.
- L'acide glutamique 437 (Poulos and Raag, 1992)
- L'hélice I alignée entièrement avec sa thréonine catalytique, T295 au niveau du CYP21 (Poulos and Raag, 1992).

Le concept des « substrate recognition sites » ou « SRSs » introduit par Gotoh et al.1992 pour les P450s de type 2, en se basant sur l'alignement des cytochromes P450s mammifères avec une enzyme bactérienne, CYP101, a fourni un excellent guide d'exploration de la base de la spécificité des cytochromes P450 et des résidus clés impliqués (Szklarz and Halpert, 1997).

Les analyses de « docking » dans le site actif d'un modèle construit en 3D permettent d'identifier les résidus impliqués dans la liaison au substrat, mais ceci doit être confirmé par les études fonctionnelles : calcul de l'activité enzymatique et constantes de Michaelis et Menten. L'enzyme avec un résidu muté dans cette position doit avoir un Km augmenté et une Vmax diminuée.

1. Architecture du site actif et liaison au substrat

L'étude du site actif permet de mieux comprendre le mécanisme de sélectivité du substrat, et la réaction de catalyse. Deux endroits sont spécifiques au substrat : les canaux d'accès et le site actif lui-même. L'identification des résidus clés pour la fonction enzymatique est confirmée par des études de mutagenèse dirigée. L'identité des différents résidus clés dépend de la structure du substrat et de l'orientation particulière adaptée à ce site actif.

La réaction enzymatique peut être élucidée en plus de la caractérisation du site actif : par exemple, la conversion des deux substrats de CYP21, 17-OHProgestérone et Progestérone en 11-désoxycortisol et Désoxycorticostérone respectivement, requiet deux cycles équivalents de livraison d'électrons du NADPH et d'une molécule d'oxygène, cycles au cours desquels le substrat est transformé en aldéhyde puis en alcool. Cette réaction soulève la question des résidus impliqués dans le maintien du substrat dans une position appropriée pour que cette réaction se déroule correctement. Un modèle 3D de ce complexe permet de répondre à cette question. Le premier site de reconnaissance du substrat (SRS-1), situé dans la boucle B'-C, est particulièrement important pour l'orientation du substrat. Puis, ce dernier va venir se poser au niveau du quatrième site de reconnaissance du substrat (SRS-4), au centre de l'hélice I. Des interactions directes avec le substrat vont permettre des liaisons ioniques et donc aider aux réactions de catalyse. La thréonine 310 au niveau de la P450 aromatase, correspondant au T295 dans CYP21, établirait une liaison hydrogène avec le substrat, le polarisant et promouvant une attaque par le groupement Fe-O-O- coupant la liaison C10-C19.

2. Site actif : Interprétation des données expérimentales

Les modèles 3D sont très intéressants pour expliquer l'interprétation des altérations d'activité au niveau des P450s, en modifiant certains paramètres comme les forces de Van der Waals ou la mobilité du substrat.

La suppression d'une force de Van der Waals peut entraîner une modification quantitative ou qualitative de l'activité ; l'élimination des liaisons de ce type entre le substrat et la chaîne latérale d'un résidu empêche une bonne orientation du substrat au niveau du site actif modifiant l'activité enzymatique.

L'apparition de liaisons Van der Wals est souvent liée à une diminution voir une perte d'activité. Au niveau du CYP2B4, la mutation p.I114F (SRS-1) retarde la liaison du benzyloxyresorufin ainsi que l'androstenédione en position 16b-, résultant en une perte d'activité (Szklarz et al., 1996).

La mobilité du substrat peut aussi être influencée par la mutation d'un résidu entraînant une diminution ou perte d'activité. La mutation p.P105L au niveau du CYP21, avec pour la leucine une chaîne latérale plus longue que celle de la proline, pourrait augmenter la mobilité du substrat et ainsi diminuer l'activité. L'analyse de la mobilité peut être étudiée en utilisant la dynamique moléculaire.

3.Réaction d'oxydo-réduction

Une fois le substrat lié au site actif, une réaction d'oxydo-réduction est réalisée grâce au transfert d'électrons. Une molécule d'oxygène est liée puis a lieu le transfert d'un second électron. La modélisation par homologie permet d'identifier les différents résidus impliqués dans l'interaction avec le partenaire d'oxydo-réduction. Plusieurs résidus basiques identifiés dans les hélices C, J', ainsi que dans la région « meander », paraissent impliqués dans l'interaction avec POR. Les résidus hydrophobes et aromatiques semblent être abondants du côté proximal du P450 surtout au niveau du « meander » et dans la région entre le « meander » et le domaine de liaison à l'hème, créant un environnement hydrophobe autour de l'hème.

Au niveau du CYP21, un changement mineur au niveau des résidus R339 et R341 perturbe l'activité enzymatique ; ainsi, la mutation du résidu arginine en histidine est suffisante pour diminuer l'activité enzymatique, probablement par perturbations électrostatiques.

4.Stabilité de la protéine

Plusieurs chaînes latérales au sein de la structure 3D du cytochrome interagissent ensemble afin d'assurer la stabilité protéique et sa liaison à l'hème. Des mutations au niveau de ces positions entraîneraient des effets fondamentaux sur cette stabilité donc sur la fonction enzymatique. Au niveau du CYP21, l'arginine 483 et les AA environnants, établiraient des interactions avec le résidu D322 ; les résidus contigus permettant un bon repliement de la protéine et en conséquence une stabilité de sa structure 3D. De même, les résidus E351, R354 et R408 semblent former un motif de repliement au niveau du « meander » et stabiliser la structure tridimensionnelle.

5.Limites de la modélisation par homologie

Les outils bioinformatiques ont permis de construire et valider le modèle 3D de la protéine CYP21. La modélisation par homologie a conduit à une interprétation des différents mécanismes de la fonction des P450s : catalyse, interaction avec le partenaire d'oxydo-réduction, stabilité.

La première étape fondamentale dans la construction du modèle est la ressemblance du « template » à la structure, d'où l'importance du choix de ce dernier. La validité du modèle construit va dépendre de plusieurs facteurs, le plus important est l'alignement des deux séquences protéiques.

D'autres facteurs peuvent influencer la validité du modèle comme la méthode choisie : dans la méthode de remplacement moléculaire, les coordonnées des régions strictement conservées sont identiques à celles de la protéine de référence, alors que pour un modèle de référence, il s'agit d'une moyenne de plusieurs « templates ».

La géométrie du modèle est influencée aussi par le champ de force dont l'orientation d'un substrat dans une protéine va dépendre, ceci étend la modélistaion par homologie à la dynamique moléculaire délivrant plus d'informations sur la mobilité du substrat et l'interaction avec d'autres protéines comme les partenaires d'oxydo-réduction.

Enfin la minimisation d'énergie aurait une influence sur la structure 3D de la protéine.

VI. Relation CYP21-POR

Les réactions de catalyse des P450s mammifères liés au réticulum endoplasmique dépendent de l'interaction avec POR. Cette interaction est possible grâce aux interactions des résidus basiques, arginines et lysines au niveau des P450 et des résidus acides, acides aspartiques et glutamiques, au niveau de POR. Les résidus impliqués dans l'oxydoréduction ont été identifiés après superposition du CYP2B4 et du CYP21. Les résidus impliqués dans l'oxydo-réduction du CYP2B4 ont été étudiés en détail et vérifiés par des études de mutagenèse dirigée. Dans un second temps les résidus dans CYP2B4 ont été calqués au niveau du CYP21 après superposition des deux cytochromes dans le logiciel Swiss PDB Viewer.

Vu la faible identité de séquences entre les deux cytochromes CYP21 et CYP2B4, plusieurs résidus non basiques ont été identifiés et le résidu basique le plus proche considéré à la place. Il est ainsi plus intéressant de développer des études complémentaires pour mieux identifier cette région comme des prédictions d'interactions protéine-protéine par des méthodes de « DOCKING » complétées par des études de mutagenèse dirigée similaires à celles réalisées pour CYP2B4 (Bridges et al., 1998).

VII. Construction du modèle CYP11B1

Dans le cadre de l'étude des autres déficits de l'hyperplasie congénitale des surrénales, nous avons construit un modèle 3D du CYP11B1 pour étudier la répercussion *in silico* de trois nouvelles mutations identifiées dans la population marocaine (article 3 : « Three Novels CYP 11B1 mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia due to Steroid 11ß-Hydroxylase deficiency in Moroccan population ».

1. Alignement des structures primaires des différentes familles de cytochromes P450

Un alignement structural a été réalisé avec plusieurs séquences de cytochromes P450s afin d'analyser la structure des régions conservées. Les séquences homologues au CYP11B1s

humains ont été retrouvées grâce à un "BLAST" réalisé dans la base de données « UNIPROT », alignées avec CLUSTAL W enfin l'alignement a été édité avec « Genedoc » (voir article 3).

2. Modèle tridimensionnel du CYP11B1

2.1.Construction du modèle tridimensionnel

Nous avons utilisé le logiciel « Deep View » pour construire le modèle tridimensionnel du cytochrome CYP11B1 (figure 55). Le « template » utilisé est le modèle 3D du CYP2C5 (code pdb : 1n6b) ; la même structure 3D qui a servi pour celui du CYP21.

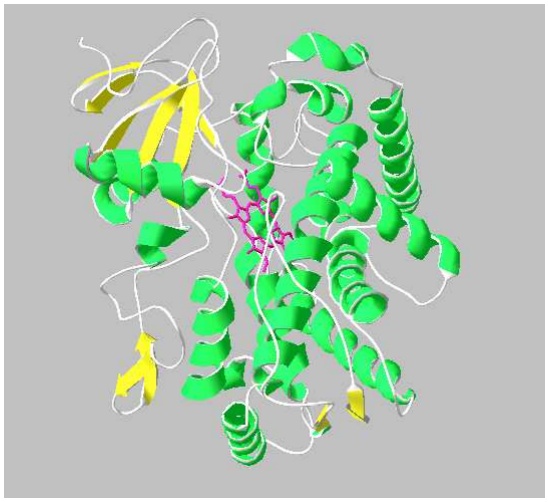


FIGURE 55 : Modèle tridimensionnel du CYP11B1

2.2. Validation du modèle tridimensionnel du CYP21

2.2.1. Validation des structures secondaires à l'aide du serveur «MATRAS»

D'après l'alignement obtenu avec le serveur MATRAS (figure 56), il existe une grande similarité de séquences des structures CYP11B1 (Sec A) et CYP2C5 (Sec B) ce qui est en faveur d'un bon choix du « template ».

```
     :                       H1      H2    E1       E2     H3
SecA :      S   TTTTTTTTS TT HHHHHHHTHHHH SEEEEESSS EEEEE SHHHHHHH
  46 :GNRWLRLLQIWREQGYEDLHLEVHQTFQELGPIFRYDLGGAGMVCVMLPEDVEKLQQVDS: 105
      *
  27 :GKLPPGPTPFPIIGNILQIDAKDISKSLTKFSECYGPVFTVYLGMKPTVVLHGYEAVKEA:  86
SecB :      S   TTTTTGGGS TT HHHHHHHHHHHH SEEEEESSS EEEEEESHHHHHHH
     :                       H1            E1       E2     H2

     :    H4        H5              H6                      H7
SecA :HTTTHHHH  B   HHHHHHTTT SSTT  HHHHHHHHHHHHHHSSTTSSSSS HHHHHH
 106 :LHPHRMSLEPWVAYRQHRGHKCGVFLLNGPEWRFNRLRLNPEVLSPNAVQRFLPMVDAVA: 165
      *             *               *        *         *
  87 :LVDLGEEFAGRGSVPILEKVSKGLGIAFSNAKTWKEMRRFSLMTLRNFGMGKRSIEDRIQ: 146
SecB :HTTTHHHHBEE   HHHHHHTTT SSSS  HHHHHHHHHHHHHHTSTTSSSSS HHHHHH
     :    H3   E3   H4              H5                      H6

     :                        H8                  H9
SecA :HHHHHHHHHHTTTT  B TTTTTTHHHHHHHHHHHHS    TT HHHHHHHHHHHHHHH
 166 :RDFSQALKKKVLQNARGSLTLDVQPSIFHYTIEASNLALFGERLGLVGHSPSSASLNFLH: 225
               **                *
 147 :EEARCLVEELRKTNASPCDPTFILGCAPCNVICSVIFHNRFDYKDEEFLKLMESLHENVE: 206
SecB :HHHHHHHHHHTTTT  B TTTHHHHHHHHHHHHHHS    TT HHHHHHHHHHHHHHH
     :                      H7                  H8

     :       H10    H11     H12                                H13
SecA :HH  S THHHHH  HHHHH TTHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHS  TT   SHHHH
 226 :ALEVMFKSTVQLMFMPRSLSRWTSPKVWKEHFEAWDCIFQYGDNCIQKIYQELAFSRPQQ: 285
      *                       *       *
 207 :LLGTPWLQVYNNFPALLDYFPGIHKTLLKNADYIKNFIMEKVKEHQKLLDVNNPRDFIDC: 266
SecB :HH  S TTHHHH THHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHS  TT   SHHHH
     :        H9    H10   H11                                H12

     :              H14                                 H15
SecA :HHHHTSSS  TT  HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTHHHHHHHHHHHHH
 286 :YTSIVAELLLNAELSPDAIKANSMELTAGSVDTTVFPLLMTLFELARNPNVQQALRQESL: 345
                        * *    **   *        *  *
 267 :FLIKMEQENNLEFTLESLVIAVSDLFGAGTETTSTTLRYSLLLLLKHPEVAARVQEEIER: 326
SecB :HHHHTSSS  TT  HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHH
     :              H13                                 H14

     :          H16   H17                   E3    E4   E5     E6
SecA :HTTTTS   THHHHT HHHHHHHHHHHHHH TTTT S EE SS EEETTEEE TT EEEE
 346 :AAAASISEHPQKATTELPLLRAALKETLRLYPVGLFLERVVSSDLVLQNYHIPAGTLVRV: 405
        *   *                          *   *  *    ** ** **
 327 :VIGRHRSPCMQDRSRMPYTDAVIHEIQRFIDLLPTNLPHAVTRDVRFRNYFIPKGTDIIT: 386
SecB :HTTTTS   THHHHT HHHHHHHHHHHHHHTSSTT S EE SS EEETTEEE TT EEEE
     :          H15   H16                   E4    E5   E6     E7

     : H18                                          H19
SecA : HHHHHT TTTSSSTTS  GGGGB TTS B   TT  TT  STTS SSHHHHHHHHHHH
 406 :FLYSLGRNPALFPRPERYNPQRWLDIRGSGRNFYHVPFGFGMRQCLGRRLAEAEMLLLLH: 465
      * *       ** *    *   **  *                              * *
 387 :SLTSVLHDEKAFPNPKVFDPGHFLDESGNFKKSDYFMPFSAGKRMCVGEGLARMELFLFL: 446
SecB :EHHHHHT TTTSSSTTS  GGGGB TTS B   TT  TT  STTS SSHHHHHHHHHHH
     : H17                                          H18

     :
SecA :HHHHHH   B SS GGG        SSS       BB
 466 :HVLKHLQVETLTQEDIKMVYSFILRPSMCPLLTFRAIN: 503
                *
 447 :TSILQNFKLQSLVEPKDLDITAVVNGFVSVPPSYQLCF: 484
SecB :HHHHHHEEEE SS GGG     EE SSSEE     BEE
     :      E8              E9    E10     E1
```

H = Hélice alpha, E = Brin étendue, G = hélice 3/10, I = Hélice pi, T = Tour lié par des liaisons hydrogènes, S = coude

FIGURE 56 : Alignement des structures secondaires du CYP21 et CYP2C5

2.2.2. Validation des structures tertiaires

A/ Superposition des deux structures CYP11B1 et CYP2C5(1N6B) et calcul du rmsd (*Root Mean Square Deviation ou déviation structurale)*

Le résultat du RMSD global de 0.59 montre un repliement similaire des deux protéines, CYP2C5 et CYP11B1 (tableau 32).

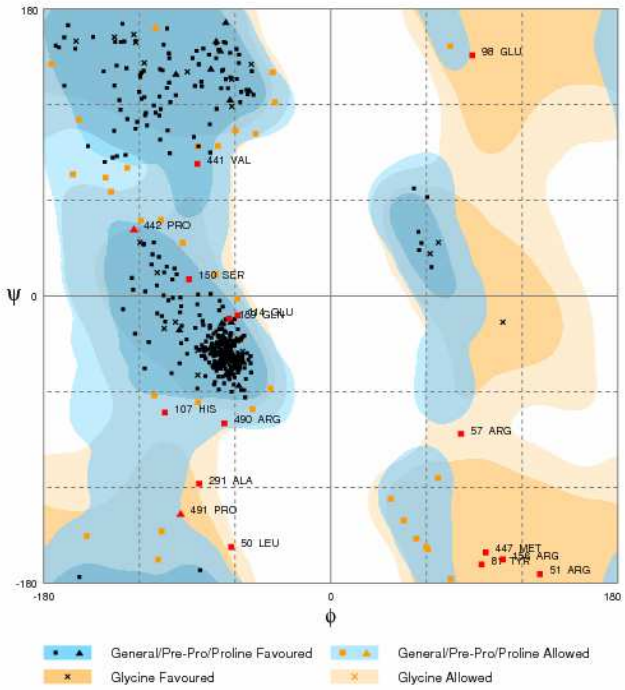
TABLEAU 32 : RMSD global des deux structures : 1N6B et CYP11B1

RMSD global				
	Carbones alpha	Chaîne carbonée	Lourds	tous
RMSD	0.08	0.11	0.59	0.59
Atomes	458	1832	2648	2648
Structure		**Résidus**		
1N6B chaîne 'A'		27-484		
CYP11B1		46-503		

B/ Comparaison des diagrammes de Ramachandran

Les diagrammes de ramachandran des deux structures CYP2C5 et CYP11B1 sont obtenus grâce au serveur http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php et sont présentées dans la figure 57.

Les résidus de la structure du CYP11B1 sont majoritairement dans les régions favorisées (89%), un petit nombre se trouve dans les régions permises (7.5%) et 3.5% dans les zones interdites, ceci nous a permis de valider la modèle 3D.




```
Number of residues in favoured region (~98.0% expected):  406 (89.0%)
Number of residues in allowed region  ( ~2.0% expected):   34 ( 7.5%)
Number of residues in outlier region                  :   16 ( 3.5%)
```

FIGURE 57 : Diagramme de ramachandran du CYP11B1

C/ <u>Calcul d'énergie: Anolea, Verify 3D et Gromos</u>

Après soumission du modèle 3D d'une protéine dans le logiciel « Deep View », le fichier pdb de la structure 3D nous est retourné avec des résultats de calculs d'énergie des différents résidus de la protéine (méthode Anoléa, Vérfy 3D et Gromos), les résultats étaient en faveur d'un modèle 3D valide.

ARTICLE 1

p.H62L, a Rare Mutation of the CYP21 Gene Identified in Two Forms of 21-Hydroxylase Deficiency

R. Menassa,* V. Tardy,* F. Despert, C. Bouvattier-Morel, J. P. Brossier, M. Cartigny, and Y. Morel

Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares (R.M., V.T., Y.M.), Centre de Biologie et de Pathologie Est, 69677 Bron, France; Centre de Pédiatrie (F.D.), Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37044 Tours, France; Centre de Pédiatrie (C.B.-M.), Groupe Hospitalier Cochin St. Vincent de Paul, 75014 Paris, France; Service de Pédiatrie-Néonatologie (J.P.B.), Centre Hospitalier, 85000 La Roche sur Yon, France; and Endocrinologie (M.C.), Centre de pédiatrie Hôpital Jeanne de Flandre, 59037 Lille, France

Context: Steroid 21-hydroxylase deficiency is the most common enzymatic defect causing congenital adrenal hyperplasia with good genotype/phenotype relationships for common mutations. To determine the severity of rare mutations is essential for genetic counseling and better understanding of the structure-function of the cytochrome P450c21.

Objective: The p.H62L mutation was the most frequent of 60 new mutations detected in 2900 steroid 21-hydroxylase deficiency patients, either isolated or associated on the same allele with a mild mutation (p.P453S, p.P30L, or partial promoter). Because phenotypes seemed to differ between patients with isolated or associated p.H62L, a detailed phenotype description and functional studies were performed.

Results: Regarding phenotype, patients with isolated p.H62L had a nonclassical form, whereas patients with the association p.H62L + mild mutation had a simple virilizing form. Functional studies showed that p.H62L reduced the conversion of the two substrates, progesterone and 17-hydroxyprogesterone, in the same way as the mild p.P453S; the association p.H62L + p.P453S decreased enzymatic activity more strongly while conserving residual activity at a level intermediate between p.P453S and p.I172N. This suggested that p.H62L was a mild mutation, whereas a synergistic effect occurred when it was associated. Analysis of p.H62L in a three-dimensional model structure of the CYP21 protein explained the observed *in vitro* effects, the H62 being located in a domain implied in membrane anchoring.

Conclusion: According to phenotype and functional studies, p.H62L is a mild mutation, responsible for a more severe phenotype when associated with another mild mutation. These data are important for patient management and genetic counseling. **(*J Clin Endocrinol Metab* 93: 1901–1908, 2008)**

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is an inborn autosomal recessive adrenocortical steroidogenesis error (1). Steroid 21-hydroxylase deficiency (21OHD) represents about 95% of CAH, varying widely depending on the genetic lesion, and is traditionally divided into two groups, a severe classical and a milder nonclassical form (1, 2). The classical form comprises female external genitalia virilization by fetal adrenal androgen hyperproduction and severely impaired glucocorticoid and mineralocorticoid secretion; in salt-wasting (SW) 21OHD, life-threatening neonatal salt loss occurs during the first month of life, and in simple virilizing (SV) 21OHD, the mineralocorticoid disorder is less severe, with clinical salt loss only in case of stress. In both SW and SV, the mineralocorticoid defect is attested by increased plasma renin. Before neonatal screening, SV in males

0021-972X/08/$15.00/0

Printed in U.S.A.

Copyright © 2008 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2007-2701 Received December 7, 2007. Accepted February 27, 2008.

First Published Online March 4, 2008

* R.M. and V.T. contributed equally to this work and should be considered as equal first authors.

Abbreviations: CAH, Congenital adrenal hyperplasia; DOC, 11-deoxycorticosterone; NC, nonclassical; 21OHD, steroid 21-hydroxylase deficiency; 17OHP, 17-hydroxyprogesterone; PDB, Protein Data Bank; SV, simple virilizing; SW, salt-wasting; WT, wild-type.

Downloaded from jcem.endojournals.org at Centre Hosp Lyon Sud Pr Orgiazzi I894 on June 2, 2008

was often diagnosed only in childhood (3–7 yr) by precocious pseudopuberty leading to true precocious puberty and decreased adult height. In the nonclassical (NC) form, mineralocorticoid secretion is conserved, female virilization absent, and phenotypic manifestations milder. Children of both sexes present milder hyperandrogenism than in SV; women refer for hirsutism, menstrual irregularity, and decreased fertility, and men are often asymptomatic.

Two 21-hydroxylase loci are located on chromosome 6p21.3 within the HLA class III gene region: functional CYP21A2 and its nonfunctional pseudogene CYP21A1P, duplicated in tandem with C4 genes (3). The high homology of these duplicated regions causes misalignment during meiosis, resulting in genetic lesions (2, 4–6), large (deletions, gene conversions) in 20% and point mutations in 80% of cases, most of the latter being small conversions. About 114 deleterious mutations were published (http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp21.htm), including IVS2-13A/C>G, p.I172N and p.V281L, the most common in SW (30–35%), SV (14–18%), and NC (>50%), respectively (5, 7, 8).

Good genotype-phenotype correlations were demonstrated for common mutations (2, 4, 5, 9–13). The compound heterozygous phenotype is determined by the mildly affected CAH allele. Rare mutation severity is predicted for nonsense and frameshift but not missense mutations, which are the most frequent and where it should be deduced from the phenotype only if the cohort is large enough. *In vitro* enzyme function assay after site-directed mutagenesis is often the only way to determine impaired hormonal secretion, especially in males detected by neonatal screening and compound heterozygotes with mild mutation on the other allele. Moreover, the evaluation of the severity's degree of the association of two mild mutations on the same allele, although more difficult to estimate, is essential for genetic counseling. Such associations, with more severe phenotype than either isolated mutation, have been reported: p.P453S with p.R339H (14) and p.P453S with p.P105L (15).

Our screening of more than 5000 21OHD alleles identified 60 new mutations, with p.H62L (c.185A>T), in the first exon, being the commonest (16); it was identified in 13 patients from 12 unrelated families, either isolated or associated on the same allele with a mild mutation: p.P453S, p.P30L, or partial promoter conversion of CYP21A2 (−113G>A, −110T>C, and −103A>G). The phenotype for p.H62L associated with mild mutation was more severe than with isolated p.H62L. We here report good phenotype-genotype correlation using detailed phenotypes and functional studies. This evaluation was essential for genetic counseling, because prenatal diagnosis and dexamethasone treatment have to be proposed only for fetuses at risk of classical 21OHD (17).

Patients and Methods

Genotyping of CYP21A2 was performed in 2900 patients, 1570 with classical and 1330 with NC form; new mutations were detected in 130 patients (4%), most frequently p.H62L (13 patients, 0.4%).

Patients

Data of the 13 patients are summarized in Table 1.

Females 1 and 2 were diagnosed in adulthood by mild signs of hyperandrogenism (hirsutism and dysmenorrhea). 21OHD was confirmed by elevated 17-hydroxyprogesterone (17OHP), from 69 to 108 nmol/liter after ACTH test for female 1 and basal 17OHP at 99.4 nmol/liter for female 2. Final heights were as expected (respectively, 1.75 and 1.63 m).

Female 3 was diagnosed at 7 yr by isolated clitoromegaly and pubic hair. 21OHD was confirmed by elevated 17OHP, from 115 to 345 nmol/liter after ACTH test. Not treated, she presented with primary amenorrhea.

Female 4 was symptomatic since 1 yr of age, presenting with clitoromegaly and advanced stature and bone age. 21OHD was confirmed at 7 yr by elevated 17OHP at 780 nmol/liter; stature was advanced at +5 SD and bone age at 11 yr, with decreased final height of 1.57 m.

Female 5 was not diagnosed at birth despite considerable clitoromegaly (Prader stage 3), noted by her mother. Pubic hair appeared at 8 yr and axillary hair at 9, with advanced stature (+2.5 SD); she was referred to endocrinology only at 11 yr, for increased virilization, deep voice, hirsutism, and abnormal muscular mass. Bone age was advanced at 16 yr, leading to decreased final height (1.53 m *vs.* a target of 1.60 m). Basal 17OHP was elevated (159 nmol/liter) as were androgens, although mineralocorticoid function was unaltered (data not transmitted).

Female 6 was seen at 18 months for advanced stature and clitoromegaly; acne appeared at 2 yr, and pubic hair at 6. 21OHD was diagnosed by elevated 17OHP at 360 nmol/liter, reaching 540 nmol/liter at the age of 8 yr, despite hydrocortisone treatment. Androgen levels were high. Final height was decreased (1.63 m) compared with her parents (1.90 and 1.60 m).

Female 7 was presented with external genitalia virilization (Prader 2); neonatal screening was negative (48 nmol/liter, cutoff at 60 nmol/liter), but elevated 17OHP (224 nmol/liter) and androgens at 3 months confirmed 21OHD.

Female 8 was born at 33 wk gestation, presented with clitoromegaly at birth; neonatal screening was positive (121 nmol/liter, cutoff at 60 nmol/liter), but because she was born preterm, successive high controls (112 nmol/liter on d 10 to 297 nmol/liter on d 66) were essential to confirm diagnosis. Elevated renin suggested mineralocorticoid deficiency.

Male 9 was a nephew of a SV patient (p.I172N/deletion); basal 17OHP at 1 month (48 nmol/liter) and ACTH test at 3 months (17OHP from 14 to 130 nmol/liter) confirmed 21OHD. He presented with moderately advanced bone age at 6 yr.

Male 10 was symptomatic since 5 yr of age, presenting with precocious pseudopuberty and acne. 21OHD was confirmed at 7 yr by elevated 17OHP (from 350 to 471 nmol/liter after ACTH) and androgens.

Male 11 presented with advanced stature since 1 yr of age but was diagnosed at only 10.6 yr by precocious pseudopuberty. Basal 17OHP levels were elevated at 456 nmol/liter.

Male 12 was undetected by neonatal screening and referred to pediatrics at 4.3 yr with considerable phallic growth; he presented with greatly advanced stature (+4.2 SD) and bone age estimated at 9–10 yr. Elevated basal 17OHP (350 nmol/liter) and androgens confirmed 21OHD.

Male 13 presented with precocious pseudopuberty at 4.6 yr and was diagnosed at 6.10 yr; 17OHP was elevated, from 1678 to 1809 nmol/liter after ACTH.

Molecular study of CYP21A2

Peripheral blood was sampled from patients and parents (if available) after informed consent. Molecular study of CYP21A2 used specific amplification by PCR followed by entire gene sequencing, from the 5′ regulatory region (c.−400) to the end of translation. The PCR program was: 95 C for 10 min; 30 cycles of 20 sec at 95 C, 20 sec at 60 C, and 20 sec at 72 C; and a final 10-min 72 C extension. PCR and sequencing products were purified using the Millipore (Billerica, MA) system. Sequencing products were run on ABI Prism Genetic Analyzer 3130.xl (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers sequences are available on request.

Downloaded from jcem.endojournals.org at Centre Hosp Lyon Sud Pr Orgiazzi I894 on June 2, 2008

Downloaded from jcem.endojournals.org at Centre Hosp Lyon Sud Pr Orgiazzi l894 on June 2, 2008

TABLE 1. Clinical data of the patients

Case	Sex	Age of symptoms/age of diagnosis (yr)	Clinical data	17OHP (nmol/liter) basal/post-ACTH	Renin (ng/liter)	ACTH (pg/ml) cortisol	Androgens (nmol/liter)	Genotype
1	F	15/26	Dysmenorrhea, amenorrhea after pill	69/108			17.1 (Δ4), 4.8 (T)	H62L/del
2	F	NT/18	Primary amenorrhea, moderate hirsutism	99.4/ND			20 (Δ4), 3.4 (T)	H62L+partial promoter/IVS2–13A/C>G
3	F	NT/7	Prader 1, pubic hair, primary amenorrhea	115/345		67	4.76 (T)	H62L+P453S/large lesion
4	F	1/7.6	Prader 1, BA 11.6/CA 7.6	780/ND				H62L+P453S/Q318X
5	F	Birth/11	Prader 3, raucous voice, hirsutism	159/ND	Normal		39.6 (Δ4), 15 (T)	H62L+P453S/IVS2–13A/C>G
6	F	1.6/6	BA 16/CA 11, Prader 1, acne, pubic hair, BA 10/CA 6	360/ND			10.5 (Δ4), 5.4 (T)	H62L+P453S/I172N
7	F	Birth/0.3	Prader 2, no surgery	224/ND	Normal		25.75 (Δ4), 3.27 (T)	H62L+P453S/I172N
8	F	Birth /0.2	Prader 1, regression under treatment	112/ND	800		7.8 (Δ4), 0.71 (T)	H62L+P453S/I172N
9	M	6/0.1 (related to a SV)	BA 7.6/CA 6	48/ND	Normal		3.9 (Δ4), 4.18 (T)	H62L/I172N
10	M	5/7	BA 11.6/CA 7 Pubic hair acne	350/471		16.9	19.6 (Δ4), 2.6 (T)	H62L+P453S/Q318X+R356W
11	M	1/10.6	BA 14/CA10.6	456/ND		Increased		H62L+P453S/Q318X
12	M	NT/4.3	BA 9–10/CA 4.3, pubic hair, length of penis 8 cm	348/ND	45	Decreased	20 (Δ4), 2.75 (T)	H62L+P453S/IVS2–13A/C>G
13	M	4.6/6.10	BA 13/CA 6.10, pubic hair	1678/1809	46	114		H62L+P30L/H62L+P30L

Female 3 and male 11 are siblings. Hormonal data were measured at the diagnosis. Δ 4, Androstenedione; BA, bone age; CA, chronological age; F, female, M, male; ND, not done; NT, not transmitted; T, testosterone.

Construction of plasmids and mutagenesis

In vitro studies were validated using three frequent mutations in addition to the new mutated alleles: p.I172N (c.515T>A), with about 2% residual 21-hydroxylase activity and responsible for SV (18), and two mutations associated with the NC form: p.V281L (c.841G>T), with about 50% residual 21-hydroxylase activity for 17OHP and 20% for progesterone (18), and p.P453S (c.1357C>T), with 68% residual 21-hydroxylase activity for 17OHP and 46% for progesterone (15).

Human full-length *CYP21A2* cDNA cloned into the pCMV4 vector was kindly provided by Dr. Bon Chu Chung (19). Mutations were introduced using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA).

Control plasmid construction used the following primers (with mutation introduced in the middle of the primer and indicated in bold lowercase letter): for p.I172N, I172N forward 5′-CAC CTG CAG CAT CA**a** CTG TTA CCT CAC CTT CGG-3′ and I172N reverse 5′-CCG AAG GTG AGG TAA CAG **t**TG ATG CTG CAG GTG-3′; for p.V281L, V281L forward 5′-GGA AGG GCA C**t**T GCA CAT GGC TGC AGT GGA CC-3′ and V281L reverse 5′-GGT CCA CTG CAG CCA TGT GCA **a**GT GCC CTT CC-3′; and for p.P453S, P453S forward 5′-CCT TCA CGC TGC TG**t** CCT CCG GGG ACG CCC TGC CCT CC-3′ and P453S reverse 5′-GGA GGG CAG GGC GTC CCC GGA GG**a** CAG CAG CGT GAA GG-3′.

Mutated plasmid construction used the following primers: for p.H62L, H62L forward 5′-CCA TCT ACA GGC TCC **t**CC TTG GGC TGC AAG-3′ and H62L reverse 5′-CTT GCA GCC CAA GG**a** GGA GCC TGT AGA TGG-3′. For p.H62L+p.P453S, the plasmid containing p.H62L was used to introduce the p.P453S mutation with the primers described above.

XL1-Blue supercompetent cells were transformed with pCMV4 vectors by heat pulse, and bacteria were grown in ampicillin-containing medium. The complete *CYP21A2* cDNA was sequenced to check for the expected mutation and exclude additional sequence aberrations.

In vitro P450c21 expression in COS-1

Liposomes (Lipofectamine reagent) were used to transfect the COS-1 cells; transfection used mutant pCMV4-CYP21A2 constructs, wild-type (WT) pCMV4-CYP21A2 as reference, and native pCMV4 without CYP21A2 cDNA as negative control. According to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 3×10^5 cells (50% confluence) were cotransfected per well with 1 μg pCMV4 constructs and 1 μg growth factor (GH) as transfection control. Cell recovery and protein expression were achieved by incubating cells at 37 C, 5% CO_2 for 48 h.

Mutation severity assessment

Each mutant was compared with WT and known mutant CYP21A2. Transfected cells were incubated for 2 and 8 h at 37 C, 5% CO_2 with 1 ml DMEM/F12 medium (supplemented with L-glutamine, antibiotics, and 5% fetal bovine serum) containing 1 μCi ^{3}H-labeled substrate 17OHP or progesterone. Supernatant (500 μl) was extracted twice with 5 ml (isooctane/ethyl acetate 1:1, vol/vol), evaporated, and dissolved in ethanol [containing size markers 17OHP plus 11-deoxycortisol/progesterone plus 11-deoxycorticosterone (DOC)]. Steroids were separated by thin-layer chromatography with chloroform/ethyl acetate (80:20, vol/vol) as mobile phase.

The plate was autoradiographed after addition of Enhance Spray for 24 h, and the autoradiographs were scanned. Mutated plasmid enzyme activity was determined by comparing spot intensity with that of the known mild and severe mutations.

GH/total protein ratios were calculated to check reproducibility of transfection efficiency, using the hGH-RIACT kit (CIS Bio International, Gif-Sur-Yvette, France).

Determination of kinetic constants

The COS-1 cells were incubated for 1 h at 37 C with 1 ml DMEM/F12 medium containing 0.5 μCi ^{3}H-labeled substrate and six unlabeled steroid concentrations: 0.5, 1, 2, 3, 4, or 6.0 μmol/liter. Postincubation treatment was as described above. To quantify residual 21-hydroxylase activity, radioactivity was counted using Scion image software (Scion, Frederick, MD). Substrate conversion per steroid concentration was calculated after correction of total protein content. Apparent kinetic constants were then calculated, using GraphPad Prism software (version 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Western blot

To determine whether decreased enzyme activity was due to reduced enzyme expression or function, protein analysis of WT and the various mutants was performed by Western blot. Antihuman CYP21A2 rabbit polyclonal antiserum was provided by Dr. W. L. Miller. This technique was performed as recommended in the standard protocol (Invitrogen kit).

Molecular modeling

Multiple sequence alignment

Many P450 cytochrome sequences were used to analyze structurally conserved regions by multiple-sequence alignment. Sequences homologous to human CYP21A2 were found using BLAST searches in the UNIPROT database (20) and aligned with CLUSTAL W (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) (21) using default parameters, displayed, and then edited using Genedoc (http://www.psc.edu/biomed/genedoc).

Human CYP21A2 (P08686) was aligned with three cytochrome groups: 1) P450c21s of mouse (P03940), rat (Q64562), bovine (P00191), sheep (Q7M366), pig (P15540), and dog (Q8WNWO); 2) other human steroidogenic P450 cytochromes, CYP11B1 (P15538), CYP11B2 (P19099), CYP11A1 (P05108), CYP17A1 (P05093), and CYP19A1 (P11511); and 3) mammalian crystallized cytochromes, rabbit CYP2C5 (P00179), rabbit 2B4 (P00178), human CYP2C8 (P10632), human CYP2C9 (P11712), and human CYP3A4 (P08684) .

Homology modeling

Our model was human CYP21A2, previously generated (22) and available at the Protein Data Bank with ID 2GEG (23). It is based on the mammalian x-ray crystallographic cytochrome CYP2C5 (PDB code 1N6B), which shares 32% sequence identity and 50% sequence similarity. We determined the protein domains (heme group binding, steroid binding, and redox partner interaction) and studied new mutation effects *in silico*, with the help of the DeepView program (http://www.expasy.org/spdbv) (24).

Results

Molecular analysis

Whole CYP21A2 gene sequencing identified the new mutation p.H62L, either isolated (female 1 and male 9) or associated on the same allele with a mild mutation (11 of 13 patients), usually p.P453S (females 3–8 and males 10–12) but also p.P30L (male 13) and partial promoter conversion of CYP21A2 (−113G>A, −110T>C, −103A>G) (female 2), the usually associated −126C>T being absent in this case.

Phenotype severity

Enzymatic impairment was assessed by neonatal screening detection, basal and post-ACTH 17OHP levels, mineralocorticoid defect attested by renin level, and androgen levels.

Only three patients were born after neonatal screening was introduced; all bore the p.H62L+p.P453S allele, and the only one detected on screening was born preterm. Basal 17OHP was significantly higher for the 10 patients with p.H62L+p.P453S or

Downloaded from jcem.endojournals.org at Centre Hosp Lyon Sud Pr Orgiazzi I894 on June 2, 2008

p.P30L (from 115-1678 nmol/liter; mean = 494.7 nmol/liter) than for the female with p.H62L+partial promoter (99 nmol/liter) or for the two isolated p.H62L patients (from 13–69 nmol/liter; mean = 41 nmol/liter). Post-ACTH levels were also higher, from 345-1809 nmol/liter (mean = 875 nmol/liter) for patients with p.H62L+p.P453S or p.P30L and from 108–116 nmol/liter (mean = 112 nmol/liter) with isolated p.H62L. Mineralocorticoid function remained difficult to assess; renin levels were not available for patients born 20 yr ago (females 1–4 and males 10–11) or measured under hydrocortisone (female 6). Levels were elevated only in female 8, bearing p.H62L+p.P453S. Androgen levels were higher for the 10 patients with p.H62L+p.P453S than for the other three, taking into account age and sex (25).

Hyperandrogenism was assessed by external genitalia virilization, age at symptom onset and diagnosis, bone *vs.* chronological age at diagnosis, and final height (indicators of disease evolution).

All six females bearing p.H62L+p.P453S presented with external genitalia virilization, in contrast to the two with isolated p.H62L or p.H62L+promoter. Two had presented with considerable virilization at birth: Prader 2 for female 7 (not requiring surgery) and Prader 3 for female 5 diagnosed at puberty and corrected by surgery. Virilization was less severe in four females (isolated clitoromegaly), although female 6 asked for repair surgery.

First symptoms appeared during childhood for the six females with p.H62L+p.P453S and after puberty for the other two (p.H62L and p.H62L+partial promoter). Advanced childhood bone age was significant for the six females, leading to final height below target; the two diagnosed in adulthood presented with NC symptoms (hirsutism and dysmenorrhea), and their final height was more reasonable. All four males with associated p.H62L presented with first signs early in childhood (1–5 yr), whereas male 9, bearing isolated p.H62L, became symptomatic after age 5 yr; likewise, bone age was more advanced in the four males, leading to decreased final height, whereas growth was well controlled by hydrocortisone for male 9. Male 12 presented with very severe hyperandrogenism, with 8 cm phallic growth at age 4.3 yr.

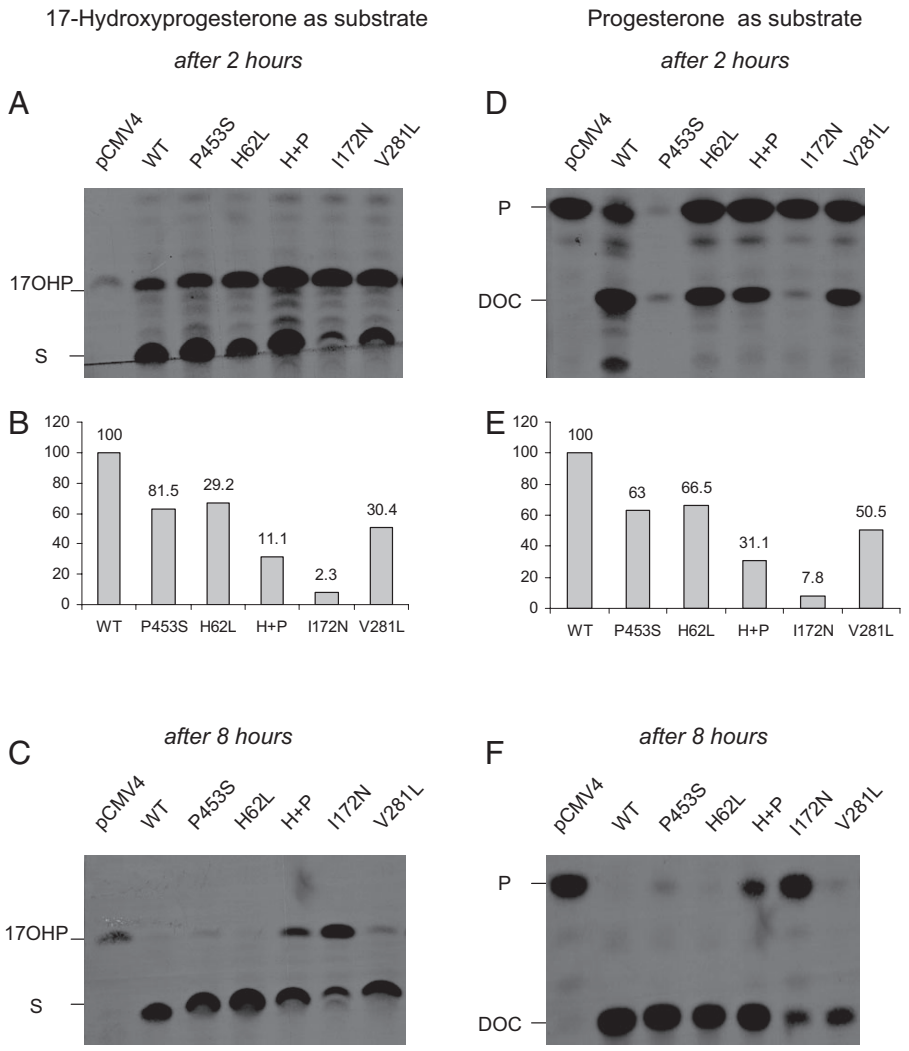


FIG. 1. Functional study of the normal protein (WT) and the different mutant human P450c21 (P453S, H62L, and H62L+P453S). Autoradiography of thin layer chromatography showing conversion of 17-OHP to 11-deoxycortisol (S) (A and C) and progesterone (P) to DOC (D and F). Cells were transfected with the different vectors pCMV4 (vector without insert), WT (wild-type), and mutated CYP21A2 cDNAs [P453S, H62L, H+P (H62L+P453S), I172N, and V281L] and incubated with 1 μCi substrates for 2 h (A and D) and 8 h (C and F). CYP 21 *in vitro* activity columns represent the relative activities of CYP21 mutants after 2 h of incubation, WT being defined as 100% (B and E).

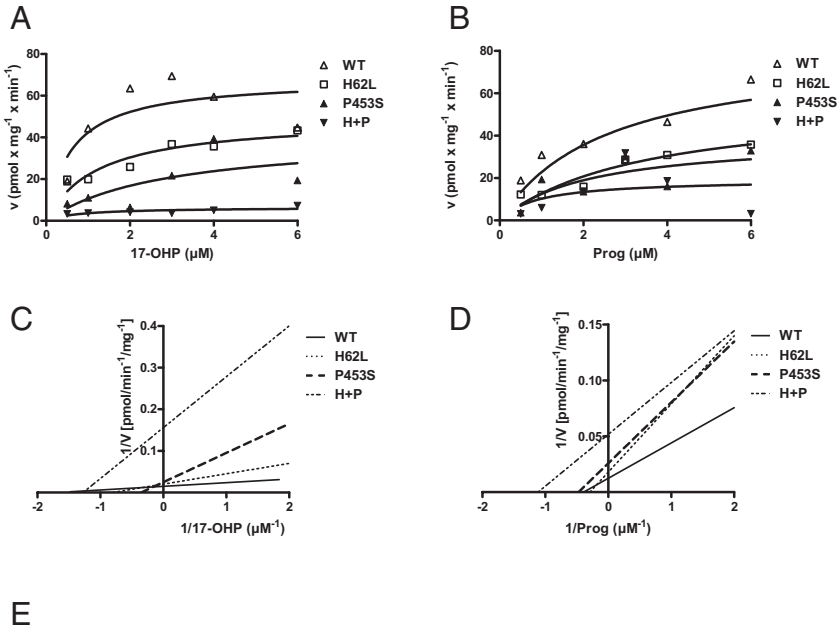
Patients with isolated p.H62L were under hydrocortisone, and the female with p.H62L+partial promoter under Androcur; fludrocortisone was added for four of the 10 with associated p.H62L. Treatment was initiated as of diagnosis for all patients except female 6, treated 7 yr later.

In vitro determination of mutation severity

Control transfections using CYP21A2 cDNA sequence showed 100% conversion of progesterone and 17-OHP to DOC and 11-deoxycortisol, respectively, demonstrating expected WT enzyme 21-hydroxylase activity. Transfection with vector alone did not convert the substrate (Fig. 1).

CYP21A2 cDNA constructs containing either p.P453S or p.H62L encoded enzymes catalyzing synthesis of both 11-deoxycortisol and DOC, with moderate efficiency (81.5 and 29.2% for 17-OHP to 11-deoxycortisol, respectively, and 63 and 66.5% for conversion of progesterone to DOC); this activity is similar to that of p.V281L (30.4% for 17-OHP and 50.5% for

Downloaded from jcem.endojournals.org at Centre Hosp Lyon Sud Pr Orgiazzi I894 on June 2, 2008



E

	17-OHProgesterone		Progesterone	
	Km (µM)	Vmax (pmol.mg^{-1}.min^{-1})	Km (µM)	Vmax (pmol.mg^{-1}.min^{-1})
WT	0.6110	68.15	2.568	81.19
P453S	2.872	40.86	2.131	39.07
H62L	1.240	49.19	3.454	56.54
H62L+P453S	0.7864	6.433	0.8984	19.38

FIG. 2. A–D, Kinetic analyses of normal and mutant vectors P453S, H62L, H+P (H62L+P453S). A and B, Plots of velocity (V) (picomoles per milligram total protein per minute) against substrate concentration (micromoles per liter): conversion of 17-OHP to 11-deoxycortisol (A) and of progesterone (Prog) to DOC (B). C and D, Corresponding Lineweaver-Burk plots of enzymatic activity (C and D). E, Table of K_m and V_{max} values of normal (WT) and mutant variants [P453S, H62L, and (H62L+P453S)].

progesterone). When both p.P453S and p.H62L were introduced in the same construct, the encoded enzyme displayed more severely decreased activity than with the two isolated mutants (11.1% for 17-OHP and 31.1% for progesterone) but less severely than the construct with the p.I172N mutant (2.3% for 17-OHP and 7.8% for progesterone).

Kinetic analysis of the mutants revealed K_m values in the same range, whereas maximal velocity was lower than WT (Fig. 2).

Western blot analysis detected comparable amounts of P450c21 for the various constructions, suggesting that reduced enzyme activity was not due to a decreased amount of protein (Fig. 3).

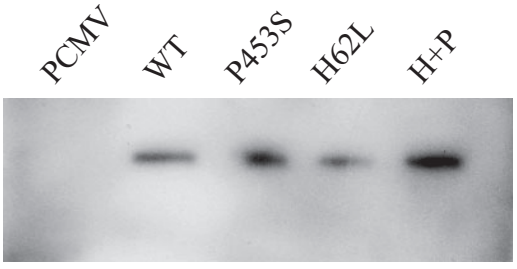


FIG. 3. Immunoblots of CYP21A2 protein expressed in COS-1 cells and collected after harvesting cells directly from the well with a lysis buffer.

Discussion

We reported a new mutation p.H62L in 13 patients, isolated or associated on the same chromosome with a mild mutation. Because 12 patients had a severe CYP21A2 lesion on their other allele (null lesion responsible for SW, IVS2–13A/C>G for SW or SV, and p.I172N for SV), the new mutated allele's severity was predictable from phenotype.

Clinical and biological analysis indicated that isolated p.H62L was rather responsible for the NC form, whereas the phenotype was more severe, but never for SW, when associated.

The degree of virilization of our eight females bearing allele p.H62L+p.P453S was compared with that of two cohort subgroups: 1050 females with mild mutation (p.V281L, p.P453S) on at least one allele and 230 females either homozygous for p.I172N or compound heterozygous for p.I172N and IVS2–13A/C>G or a null mutation (data not published). Females of the first subgroup were not virilized, except for 4% with isolated clitoromegaly undetected at birth and not requiring surgery. Females of the second group were virilized, except for 6%; 14% of virilized females presented with isolated clitoromegaly, 50% with associated posterior labial fusion (Prader 2 or 3), and only 30% with more severe virilization (stage 4–5).

According to *in vitro* studies, isolated p.H62L is responsible for the NC form, and the association p.H62L+p.P453S for a more severe form, intermediate between NC represented by p.V281L and SV form represented by p.I172N (Fig. 1).

The p.H62L+p.P30L allele in patient 13 also seemed more severe than isolated p.P30L in terms of bone age advancement and very elevated 17-OHP, suggesting synergy. However, p.P30L phenotypic heterogeneity was reported in eight patients, five with the SV and three with the NC form (12). Nevertheless, according to *in vitro* studies, p.P30L led to the same residual activity as p.V281L and p.P453S (26). After this previous study, we reported that p.P30L severity depends on the presence or absence of a 5′ gene conversion of the CYP21A2 gene to CYP21A1P, not including the IVS2–13A/C>G (27).

In contrast, the allele p.H62L+promoter of CYP21A2 is less severe (female 2), probably because of the presence of only three of the four mutations usually described.

The H62 residue is located in the β1-sheet region, in a large hydrophobic area considered important for membrane anchor-

Downloaded from jcem.endojournals.org at Centre Hosp Lyon Sud Pr Orgiazzi I894 on June 2, 2008

ing. Three hydrophobic patches are important to cytochrome structure, including amino acids 60–69 of the CYP2C5 cytochrome corresponding to 54–63 in CYP21A2. The basic residues of this patch operate as a halt transfer signal, preventing the remainder of the protein translocating through the endoplasmic reticulum after the cotranslational insertion of the leader sequence into the membrane (28). Substituting basic histidine by hydrophobic leucine should increase protein immersion in the membrane and thus disturb enzymatic function. The P453 residue, located in the C-terminal part of the protein, distant from steroid and heme binding (Fig. 4B), is well conserved between 21-hydroxylases in various species but less in other human steroidogenic P450 cytochromes and other mammalian nonsteroidogenic cytochromes (Fig. 4A). Replacing proline by polar serine should increase the protein's structural flexibility and thus decrease its stability. The association of the two mutations should have a synergistic effect, decreasing exposure to the active site of the endoplasmic reticulum and protein stability.

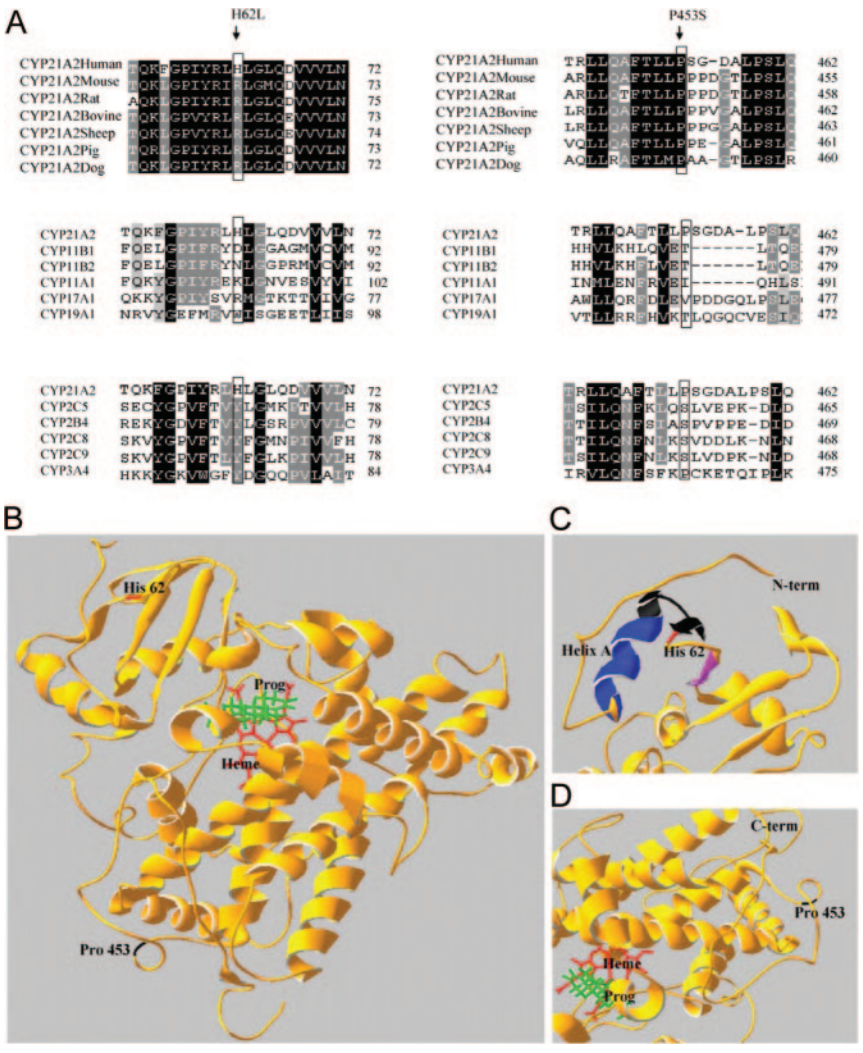


FIG. 4. A, Multiple amino acids alignments of human CYP21A2 with other mammalian CYP21A2s, mammalian crystallized CYPs, or human steroidogenic cytochromes. Sequence alignment was performed with CLUSTAL W and edited with Genedoc. The *dark-shaded* regions represent the amino acids conserved across all P450s in alignment and *lighter shades* represent lesser levels of similarity according to Genedoc. The mutant residues are indicated with an *arrow* in human CYP21A2. B–D, Molecular modeling of the human P450c21; B, total view of the three-dimensional model structure of CYP21A2; localization of progesterone (*green*) and heme (*red*); C, localization of the H62 in the N-terminal part of the protein, in a hydrophobic patch probably involved in the anchoring of the cytochrome into the membrane; D, localization of the P453 in the C-terminal part of the protein distant from the substrate and the heme disturbing the protein function by another mechanism.

The association of p.P453S with another new mild mutation has already been described. Association with p.P105L was studied *in vitro*, revealing a synergistic inhibitory effect with enzyme activity reduced to 10% for 17OHP and 7% for progesterone (15). Association with mild mutation p.R339H was described in a woman presenting severe hirsutism and clitoromegaly (14), but the combined effect of the two mutations has never been studied, *in vitro* or *in silico*.

In conclusion, p.H62L is a mild new mutation responsible for the NC form when isolated or associated with partial mutation of the promoter. In contrast, its association with mild p.P453S or p.P30L is responsible for a more severe phenotype, intermediate between the NC form associated with mild p.V281L and the SV form associated with severe p.I172N. This study underlines the importance of complete CYP21A2 sequencing for accurate genotyping and genetic counseling. The risk of external genitalia virilization in females, due to fetal androgen excess, has to be considered; as with the SV form associated with p.I172N, genetic counseling should be proposed to parents at risk of having a child with such a genotype. Fetal sex should be determined in maternal serum around 4–5 wk gestation (17) and prenatal treatment by dexamethasone and prenatal diagnosis discussed only for female fetuses. This more severe phenotype, not always detected by neonatal screening, should be diagnosed as soon as the first signs appear, especially in males, to limit deleterious effects. In both sexes, adapted treatment should be proposed, based on complete hormonal balance of the gluco- and mineralocorticoid pathways.

Acknowledgments

We express our sincere gratitude to our clinician colleagues, who have sent samples with clinical and biological data of the patients. We are grateful to Dr. Bon Chu Chung for providing cDNA vector, to Dr. W. L.

Downloaded from jcem.endojournals.org at Centre Hosp Lyon Sud Pr Orgiazzi I894 on June 2, 2008

Miller for providing the antihuman CYP21A2 rabbit polyclonal antiserum. We also thank Maryline Murena, Muriel Manigand, and Audrey Favre for their technical assistance, Dr. Jacques Chomilier for bioinformatics assistance, and Iain McGill for linguistic help with the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Véronique Tardy, Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares, Centre de Biologie et de Pathologie Est, 69677 Bron Cedex, France. E-mail: veronique.tardy@chu-lyon.fr.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

References

1. **New M, White P, Pang S, Dupont B, Speiser P** 1989 The adrenal hyperplasias. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, eds. The metabolic basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill; 1881–1917
2. **Morel Y, Miller WL** 1991 Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Adv Hum Genet 20:1–68
3. **Higashi Y, Yoshioka H, Yamana M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y** 1986 Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. Proc Natl Acad Sci USA 83:2841–2845
4. **White PC, New MI** 1992 Genetic basis of endocrine disease. 2. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 74:6–11
5. **Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H** 1994 Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. J Clin Endocrinol Metab 78:1145–1152
6. **Morel Y, David M, Forest MG, Betuel H, Hauptman G, Andre J, Bertrand J, Miller WL** 1989 Gene conversions and rearrangements cause discordance between inheritance of forms of 21-hydroxylase deficiency and HLA types. J Clin Endocrinol Metab 68:592–599
7. **Speiser PW, New MI** 1987 Genotype and hormonal phenotype in nonclassical 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 64:86–91
8. **Deneux C, Tardy V, Dib A, Mornet E, Billaud L, Charron D, Morel Y, Kuttenn F** 2001 Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 86:207–213
9. **Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI** 1995 Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. J Clin Endocrinol Metab 80:2322–2329
10. **Miller WL, Morel Y** 1989 Molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. Annu Rev Genet 23:371–393
11. **Speiser PW, White PC** 2003 Congenital adrenal hyperplasia. N Engl J Med 349:776–788
12. **Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP** 2000 Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. J Clin Endocrinol Metab 85:1059–1065
13. **Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinos C, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fekete C, Morel Y, Brauner R** 2003 Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. J Clin Endocrinol Metab 88:2624–2633
14. **Helmberg A, Tusie-Luna MT, Tabarelli M, Kofler R, White PC** 1992 R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. Mol Endocrinol 6:1318–1322
15. **Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, Wedell A, Luthman H** 1997 Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 82:194–199
16. **Menassa R, Testard H, Despert F, Tardy V, Morel Y** 2005 H62L, a rare mutation of the CYP21 gene was responsible for two phenotypes of 21-hydroxylase deficiency. Horm Res 64(Suppl 1):329
17. **Morel Y, Tardy V, Costa JM, Forest MG, David M** 2003 [21-Hydroxylase deficiency: new strategies emerging from molecular studies]. Ann Endocrinol (Paris) 64:456–470 (French)
18. **Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC** 1990 Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. J Biol Chem 265:20916–20922
19. **Hu MC, Chung BC** 1990 Expression of human 21-hydroxylase (P450c21) in bacterial and mammalian cells: a system to characterize normal and mutant enzymes. Mol Endocrinol 4:893–898
20. **Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N, Yeh LS** 2005 The Universal Protein Resource (UniProt). Nucleic Acids Res 33:D154–D159
21. **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** 1994 CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673–4680
22. **Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M, Wedell A, Persson B** 2006 Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. Mol Endocrinol 20:2946–2964
23. **Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE** 2000 The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res 28:235–242
24. **Guex N, Peitsch MC** 1997 SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18:2714–2723
25. **Forest MG** 1992 Adrenal function tests. In: Ranke M, ed. Functional endocrinologic diagnostics in children and adolescents. Tübingen, Germany: Karger; 248–274
26. **Tusie-Luna M-T, Speiser PW, Dumic M, New MI, White PC** 1991 A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. Mol Endocrinol 5:685–692
27. **Tardy V, Pinto EM, Forest MG, Morel Y** 2001 Phenotypic variation of P30L mutation could be explained by its association with a new 5′gene conversion of CYP21 gene to CYP21P. Pediatr Res 49:11A
28. **Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE** 2000 Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. Mol Cell 5:121–131

Downloaded from jcem.endojournals.org at Centre Hosp Lyon Sud Pr Orgiazzi I894 on June 2, 2008

ARTICLE 2

Phenotype-Genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier

V.TARDY[1]*, R.MENASSA[1]*, V.SULMONT[2], A.LIENHARDT-ROUSSIE[3], C.LECOINTRE[4], R. BRAUNER[5] , M.DAVID[6], Y. MOREL[1]

* Contributed equally to this work and should be considered as an equal first author.

Affiliations:

[1]Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Bron, France

[2] Centre de Pédiatrie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Reims, Reims, France

[3] Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France

[4] Département de Pédiatrie Médicale, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, Rouen, France

[5] Université Paris Descartes and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Bicêtre, Unité d'Endocrinologie pédiatrique, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France

[6] Endocrinologie, Diabétologie et Métabolismes pédiatriques, Hôpital mère-enfant, Bron, France

Short Title: Detailed analysis of 13 rare CYP21A2 mutations

Precis: Combination of detailed phenotype analysis and functional studies is necessary for analyzing the impairment of enzymatic activity caused by new CYP21A2 mutations

Keywords: CYP21A2, rare mutations, p.I77T, p.L167P, p.I230T, p.R233K, p.G291S, p.G292D, p.E320K, p.R341P, p.R354H, p.R369W, p.R408C, p.G424S, p.R426H, phenotype-genotype correlations, functional studies.

Word Count (article): 3665 **Word Count (abstract):** 252 **Table:** 1 **Figures:** 5

Corresponding author: Véronique TARDY, Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares, Centre de Biologie et de Pathologie Est, 69677 Bron Cedex. Email: veronique.tardy@chu-lyon.fr, Tel.: +33 4 72 12 96 78, Fax: +33 4 72 12 97 20.

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose

ABSTRACT

Context: Steroid 21-hydroxylase deficiency is the most common enzymatic defect causing congenital adrenal hyperplasia with genotype/phenotype relationships for common mutations. Novel mutations of the CYP21A2 gene must be well studied to propose right genetic counseling for patients.

Objective: Thirteen CYP21 mutations have been studied. Detailed description of phenotype was performed for all mutations (p.I77T, p.L167P, p.I230T, p.R233K, p.G291S, p.G292D, p.E320K, p.R341P, p.R354H, p.R369W, p.R408C, p.G424S and p.R426H). *In vitro* and *in silico* studies were only performed for those not previously described (p.L167P, p.I230T, p.R233K, p.G292D, p.E320K and p.R369W).

Results: Regarding phenotype, patients with 10 of these mutations had a classical form. Patient with isolated p.I230T presented with NC form and patient with the association p.I230T+p.V281L in *cis* presented with a more severe phenotype. The p.R233K mutation was detected in a carrier partner. Patient with p.R369W presented with an intermediate form. Functional studies showed that all mutations except p.I230T and p.R369W decreased enzyme activity more than p.P30L: Severity of p.R369W was intermediate between p.P30L and p.V281L and finally p.I230T was less severe than p.V281L. Mutations analysis in a three-dimensional model structure of the CYP21 protein explained the observed *in vitro* effects, severe mutations being implicated in important functional domains of the protein.

Conclusion: According to phenotype and functional studies, 11 of the mutations described, except the isolated, p.R369W and p.I230T may be responsible for a severe phenotype underlying the necessity to manage children having them. The p.I230T is a NC mutation and for the p.R369W, we need more cases to precise its severity.

Introduction

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is one of the most frequent inborn errors of metabolism, causing impaired adrenal cortisol and aldosterone production with increased androgen secretion (1, 2).

In most populations, classical CAH occurs in approximately 1 in 14.000 live births (3) and is constituted by the simple virilizing (SV) and the salt wasting (SW) forms. Both include female external genitalia virilization by fetal adrenal androgen hyperproduction and severely impaired glucocorticoid and mineralocorticoid secretion. Since neonatal screening is in place, the life-threatening neonatal salt loss that characterizes the SW has been avoided, so that molecular biology and a close follow-up of patients during first years of life has become essential to distinguish SW and SV forms. In the non classical (NC) form, mineralocorticoid secretion is conserved and female "in utero" virilization absent; phenotypic manifestations due to androgen excess are variable even absent, occurring either in childhood later than in the SV, or in adult women referred for hirsutism, menstrual irregularity and decreased fertility. Men are often asymptomatic, underlying the difficulty to evaluate the incidence of this mild form of CAH. Detailed analysis of the phenotype remains particularly helpful to separate NC and SV forms, even if current neonatal screening detects SV but rarely NC.

The 21-hydroxylase gene locus has been characterized in detail (4) and genotype-phenotype correlations have been widely studied in various ethnic and racial groups (5-9). Today, around 130 lesions of the CYP21A2 gene are published (http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp21.htm); according to our experience, there are only 7 most frequent pseudogene derived lesions (mutations or large rearrangements) representing 85% of the CAH alleles, each one occurring with a frequency superior to 3%. The less severely mutated allele determines patient's phenotype. Mutations are divided into three groups according to residual enzyme activity, depending on the nature of the mutations and *in vitro* studies in case of missense (10-12). The first group consists of mutations abolishing enzyme activity and thus associated with SW disease, as large rearrangements, nonsense, frameshift or missense mutations. The second group, found in patients with SV, consists mainly of the missense p.I172N (13); residual 21-hydroxylase activity is very low but sufficient to prevent from neonatal salt-wasting (14, 15). The third group includes mutations such as p.V281L (14) and p.P453S (16, 17) that produce enzymes retaining 20 to 70% of normal activity, depending on the experimental conditions used, and are associated with NC.

According to sequencing of 6 400 CAH alleles in our cohort of 3 200 patients, frequency of mutations is: 1) IVS2-13A/C>G (30%), large rearrangements (25%), p.I172N (17%), p.Q318X (7%) in the classical form; 2) p.V281L (55%), IVS2-13A/C>G (9%), large rearrangements (8%), p.I172N (4%) and p.Q318X (3%) in the NC form. This distribution is similar to those described by others (6, 18, 19) except Krone et al. (19) reporting a higher frequency of p.I172N (21%) than large rearrangements (7%) in the classical form.; this could be explained by a different proportion of SW vs SV in their population. In our cohort, rare mutations (frequency< 1%) were detected on almost 340/ 6 400 CAH alleles (6%). These 107 different mutations were either recurrent (43) or most often private (64). Except nonsense or frameshift mutations and rearrangements deduced as severe, most of them are missense (88/107) and require functional studies since few patient's phenotype was available for each mutation. Functional studies for only 20 mutations were already published (http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp21.htm) so that 68 remained to be tested.

We describe here 13 CYP21A2 mutations, evaluating their severity with different approaches: i) detailed phenotypes of patients based on clinical, biological data and follow-up if available ii) *in vitro* and *in silico* studies for 7 mutations, the remaining 6 being previously reported (11, 20-23).

Material and methods

Patients

Clinical and biological data of patients are presented in table 1. Patients have been referred by a French network except case 37 (Switzerland) and cases 40 and 41 (Belgium). Patients were classified according to the rare mutation they shared and to their phenotype severity: SW (patients 1-15), SV (patients 16-42), intermediate 21OHD (43-45) and NC for patient 46.

Male 47, partner of a woman affected with SV, was not described in the table as he was asymptomatic. After he was diagnosed as carrier by the ACTH test, sequencing detected a new missense private mutation.

Molecular study of the CYP21A2 gene

Peripheral blood samples were obtained from patients and both parents (if available) after an informed consent. As previously described, specific amplification of CYP21A2 by PCR was performed, followed by sequencing of the entire gene, from the 5' regulatory region (c.-400) to the end of translation (12).

Functional studies

In vitro studies were only done for mutants not previously published. In addition to wild type and empty plasmid, 3 mutant controls were used: p.I172N (c.515T>A) with about 2% residual 21-hydroxylase activity and responsible for SV (14), 2 mutations associated with the NC form, p.P30L (c.89C>T) (24) and p.V281L (c.841G>T) (14) . These mutant controls were useful for standard normalization of our functional studies and for comparison with others in the literature. Mutations were introduced using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) and verified by sequencing the entire construct (primers available on request).

In vitro expression in COS-1 cells was performed as previously described (12) except for substrate incubation. Each pCMV4 vector (1 µg) was co-transfected in the same ratio with growth factor (GH) as control. The tested plasmids were: WT pCMV4-CYP21A2 for reference, pCMV4 without CYP21A2cDNA as negative control, mutated pCMV4-CYP21A2. Activity of 21-hydroxylase in intact COS-1 cells was determined 48h after transfection followed by steroid incubation for 1h30. This incubation time was optimized to be suitable for all mutations, allowing non saturated conditions for WT and moderate mutations but sufficient for substrate conversion in case of severe mutations. Conversion of 17-OHProgesterone (17OHP) to 11-deoxycortisol (S) and Progesterone (P) to 11-deoxycorticosterone (DOC) were quantified by phosphorimaging using the FLA 7000, and the Multigauge software (Fujifilm). To verify reproductibility of transfection efficiency, the GH/total protein ratio was calculated with the hGH-RIACT Kit. Each experiment was performed 2 to 4 times to ensure results reproductibility.

For determination of apparent kinetic constants, COS-1 cells were incubated for 1 hour with 0.5, 1, 2, 3, 4 or 6.0 µM unlabeled steroid and 0.5µM 3H-labeled substrate (12). Apparent kinetic constants were calculated with Graph Pad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, version 5.0).

Expression of the WT and mutant proteins was studied by Western blotting using an anti-human CYP21A2 rabbit polyclonal antiserum kindly provided by Dr W.L. Miller. This technique was performed as recommended in the standard protocol (Invitrogen Kit).

Molecular modeling

Multiple sequence alignment

Many P450 cytochrome sequences were used to analyse the structurally conserved regions by multiple sequence alignment as previously described (12).

Homology modeling

The model used for our study was the human CYP21A2, previously generated (25) and available at PDB with ID 2GEG (26). Interaction of each mutant with the heme group, the substrate Progesterone and oxydoreduction partners, were analysed *in silico* with the "Deep View" program (27).

RESULTS AND DISCUSSION

Severity of new mutations could be deduced from phenotype of patients as they all had a severe known mutation on their other allele.

There were 24 females and 22 males, 16 of them being related. We classified them into 4 groups according to phenotype severity and to *in vitro* and *in silico* studies (table 1). In each group, mutations are presented from the most to the less severe one.

Several criteria have been used to evaluate mutation severity:

- Neonatal screening that detects the classical form and rarely the NC, basal and post-ACTH 17OHP levels for glucocorticoid defect;
- Salt wasting and renin levels before treatment or during follow-up for mineralocorticoid defect;
- Signs attesting androgen excess: prenatal virilization of external genitalia, premature pubarche, advanced bone age, final height.
- Functional and structural studies: mean activity of mutants compared to normal protein and controls, results being expressed with one SD (Table1). Relative activity was reported in columns (Fig. 1A & 1B); WT was defined as 100%, conversion of 17OHP/P for p.I172N, p.P30L and p.V281L were respectively 4.3±1.7/4.4±1.8, 34.1±18.5/38.8±22.2 and 65.6±10.9/63.4±8.7. Protein expression was evaluated by Western blot (Fig.2). *In silico* analysis was performed for all mutations and previous published data were taking into account.

Mutations associated with the SW form (patients 1-15)

Five mutations belonged to this group and we concluded to their very severe enzymatic impairment because all were responsible for virilization of external genitalia in females and salt wasting in males not treated in the first days of life. Neonatal screening was always positive when performed.

The new **p.L167P** mutation (c.500T>C) was identified in 3 patients (cases 1-3). Phenotypes correlate well with our *in vitro* studies showing a null activity (Fig.1). Leucine 167, strictly conserved between vertebrate orthologs (Fig. 3A), is located in helix E that interacts with helix I and places it in front of heme (28, 29). Presence of a Proline at position 167 should disrupt helix conformation then interaction with helix I, explaining the absence of enzymatic function (Fig.4B).

The **p.G291S** (c.871G>A), previously described in 3 patients with the SW form (20, 30), was detected in 5 patients (cases 4-8).

The new **p.G292D** (c.875 G>A) was identified in only 1 female (case 9). *In vitro* studies revealed a residual activity inferior to 1% (Fig.1 and Table 1).

The severity of these two mutations affecting strictly conserved Glycines among vertebrate orthologs is confirmed (Fig. 3B); they are located in helix I, a region close to the heme, the substrate binding (SRS 4) and the catalysis area (Glu 294 and Thr 295). In both cases, replacement of a Glycine without a side chain by a polar residue (Serine or Aspartic acid) should lead to steric hindrance (Fig. 4C).

The **p.R354H** (c.1061G>A) was identified in 2 related females (cases 10-11) and was previously described in one SW patient (21). Functional studies revealed a null activity (21). The strictly conserved R354 belongs to the ERR triad (E351/R354/R408), a folding motif in the meander that stabilizes the 3D structure and allows a covalent binding with heme.

The **p.R408C** (c.1222 C>T) was identified in 4 patients (cases 12-15) and was published in 8 patients with SW (23, 31). Severity of this mutation should be deduced from phenotype of homozygous female 12; born in Cap Vert from consanguineous parents, she first consulted in France at one year old, presenting with Prader Stage 1 but severe salt wasting during gastroenteritis. Her phenotype seemed less severe than male 13 with SW and female 14 with severe virilization, both having a null mutation in *trans*. It is however well known that degree of virilization in females could be modulated by other factors than the enzymatic deficiency, as androgen receptor (32) or POR (33) mutations.

In vitro studies of Soardi et al. (23) confirmed the very low residual activity, around 1% probably not sufficient for preventing SW (Fig.5). Arginine 408 is strictly conserved between different species but is replaced either by Histidine or Asparagine in other cytochromes. As described for p.R354H, substitution of an Arginine by a Cysteine in the ERR triade should disturb 3D structure and heme binding.

Mutations associated with the SV form (patients 16-42)

Five mutations belonged to this group. No salt wasting was observed, diagnosis was either made at birth by neonatal screening or virilization of external genitalia, or in early infancy. Renin was not systematically evaluated or measured at different ages in childhood, leading to difficulty of interpretation; however, for each mutation, there was at least one patient with increased levels. This group of patients presented with a phenotype very similar to our cohort of 500 patients affected with SV and bearing the p.I172N on at least one allele: as we previously reported, not all the 270 females were virilized and among the 130 children with neonatal screening, 8 were false-negative cases (12).

The **p.I77T (c.230T>C)** was identified in 6 patients (cases 16-21), their phenotype corresponding with the only patient described in the literature. Neonatal screening was positive when done except one false negative. Children not diagnosed at birth, presented with precocious pseudopuberty and early central puberty with a final short stature, testifying severe deficiency. Previous *in vitro* studies correlate with phenotype, the mutated protein having an activity similar to the p.I172N (11). Isoleucine 77 is localized in helix B, near the substrate recognition site 1 (34). Hydrophobicity at this position is particulary conserved among P450 cytochromes and replacement by an uncharged polar Threonine should interfere with the hinge function of the Glycines 90 and 110, two residues essential for protein opening and substrate entrance.

The new **p.E320K (c.958 G>A)** was identified in male 22, bearing the p.I172N in *trans*. He presented with precocious pseudopuberty but unfortunately mineralocorticoid function was not evaluated. *In vitro* analysis of the p.E320K confirmed a residual activity similar to the p.I172N (Fig.1). The Glutamic Acid 320 is strictly conserved among different cytochromes (Fig.3C). E320 is located in a negatively charged sequence (-$EE_{320}LD_{322}$H-) probably interacting with part of positively charged residues (-$LQPR_{483}$G-) and a hydrophobic area formed by residues 446-448(Fig.4D). All of them create a folding nucleus, crucial for protein packing (35).

The **p.R341P** (c.1022 G>C) was identified in 8 patients (cases 23-30) and previously described in 4 patients with SV (22). Neonatal screening was positive when done except in the 2 homozygotes for the p.R341P. Clinical diagnosis was made either at birth in virilized females or in early childhood because of precocious pseudopuberty.

In vitro activity was found by Barbaro et al. around 0.7% for both substrates (22), leading them to conclude to its very severe character, more severe than can be expected from our patients' phenotype (in particular, the 2 siblings not detected by neonatal screening); explanation for this apparent discrepancy should be the experimental conditions (incubation time). Arginine 341 is not well conserved between different types of cytochromes but Proline should break helix J' involved in redox partner interaction, thus explaining the severe enzymatic impairment.

The **p.G424S** (c.1270 G>A) was identified in 6 patients (cases 31-36), with phenotypic features similar to 8 out of the 11 previously described (36, 37). Only three patients (including two siblings) belonging to the cohort of Friães et al. presented with SW crises shortly after birth, but circumstances and follow-up were not detailed so that salt wasting could occur in context of stress. Neonatal screening was positive for patient 34 bearing IVS2-13A/C>G in *trans* and negative for patient 36 compound heterozygous with the p.I172N. Degree of virilization in females was variable.

Glycine 424 is strictly conserved among cytochromes (Fig.3D); this residue is important for structural elaboration of the cysteine pocket as lacking any side chain, it enables the sharp turn in combination with the Glycine 430 (38) (Fig.4E). Our *in vitro* studies confirmed a very low enzymatic activity, probably sufficient for preventing SW (1.6% and 2% for 17OHP and P respectively) (Fig.1 and 5). Kinetic properties were compared with those of WT and p.I172N (Fig.1c); decreased substrate binding capacity and maximum velocity of p.G424S confirmed its role in substrate and heme binding.

The **p.R426H** (c.1277 G>A) was identified in 6 patients (cases 37-42) and in 4 previously described patients with classical form (22, 39). Severity of this mutation can be deduced from phenotype of male 37, the only patient with a null mutation in *trans*. He presented with a phenotype of SV: positive neonatal screening and increased 17OHP and renin levels at day 8, no salt wasting. Evolution was correct under hydrocortisone and fludrocortisone, regarding growth and hormonal balance especially renin. The 5 remaining patients were adults, explaining that we collected data from only 3 of them: males were diagnosed early in infancy, requiring

fludrocortisone in addition to hydrocortisone for a correct balance. One of the 2 females was virilized, only diagnosed at 3 years old, but requiring repairing surgery of external genitalia. *In vitro* published analysis led to different residual 21-hydroxylase activities, depending on substrate incubation: after 8h of incubation, Baumegartner et al. showed a conversion around 5% of 17OHP (39) whereas Barbaro et al., using less than 1 hour, found a more severe functional impairment (22). According to phenotype of our cohort, none of the 6 patients presenting with SW, severity of the p.R426H should be intermediate between these 2 results. Arginine 426 is strictly conserved among different families of mammalian cytochromes P450; located in the cystein pocket, it is one of the four residues needed for heme propionate coordination.

Mutations with an intermediate severity (patients 43-44 and carrier)

Two mutations raised the problem of their classification between the NC and the SV forms: p.R233K detected in a carrier and p.R369W in two females with more severe phenotypes than NC form but without virilization or salt wasting. Neither phenotype nor *in vitro* studies were able to precise their severity.

The new **p.R233K** (c.698G>A) was detected in the partner of a woman affected with SV form. In France, one strategy for detection of carrier is the biochemical screening based on the maximal value of 21-deoxycortisol after ACTH test. The threshold was defined by our group at 1144 pmol/l (400 pg/ml) (40) and regarding this partner, 21-deoxycortisol was highly increased at 2714 pmol/l (949 pg/ml).

In vitro studies revealed a residual activity intermediate between p.V281L and p.I172N (Fig. 1 and 5). Arginine 233 is strictly conserved in cytochromes of different species but less in other cytochromes (Fig.3F); it is located in helix G known to play an essential role for the initial substrate recognition. Helix G is involved in the two substrate access channels which have been proposed to connect the surface of the protein to the active site (41)(Fig.4G).

The new **p.R369W** (c.1105 C>T) was detected in 2 females (cases 43-44), with a null mutation in *trans*. Female 44 was detected by neonatal screening, renin was increased; female 43 born before screening was available, was only diagnosed at 9 years because of central puberty attested by menarche; following treatment by decapeptyl, her final stature was correct. Basal and post-ACTH 17OHP levels were less increased than in previous groups.

According to our experiments, the p.R369W led to a residual activity intermediate between the 2 mild p.V281L and p.P30L (Fig.1 and 5). Arginine 369 is well conserved between 21-hydroxylases from various species but less in other P450 cytochromes (Fig.3E). This residue is localized within a sphere of 5Å including the residue E380 involved in redox partner interactions; substitution of the basic Arginine by the hydrophobic Tryptophan may cause electrostatic interactions disturbance (Fig. 4F).

Mutation responsible for the NC form when isolated and for an intermediate more severe form when associated with the p.V281L (Patients 45-46)

The new **p.I230T** (c.689 T>C) was found either isolated or associated on the same allele with the p.V281L.

Female 46 with isolated p.I230T and severe IVS2-13A/C>G in *trans*, presented with NC according to 17OHP value after ACTH.

Female 45 with p.I230T and p.V281L *in cis* and a large lesion *in trans*, presented with a more severe phenotype although external genitalia were normal: neonatal screening was positive (17OHP value just over the threshold), renin level measured at day 11 was in the superior normal limit (130 ng/l). Acute gastroenteritis led to death in early infancy. To evaluate if enzymatic impairement has been an additional factor to fatal issue of the gastroenteritis, we performed *in vitro* analysis. Decrease of enzymatic activity was less severe with isolated p.I230T than with isolated p.V281L; activity was more severely impaired, intermediate between the p.V281L or p.I230T and the p.I172N, when p.I230T and p.V281L were associated (Fig.1 and 5). We have recently described such a synergistic inhibitory effect for the rare p.H62L (12) as other groups for the p.R339H (16) or the p.P105L (17).

Isoleucine 230 is not very conserved between different cytochromes (Fig.3F) but analysis of the CYP2C5 model revealed an extensive network of hydrogen bonds including this residue. Thanks to these hydrogen bonding interactions, the polar moiety of the substrate can be readily-accommodated in the active site (Fig.4G). Replacement of the hydrophobic Isoleucine by a polar Threonine should change interaction with water molecule disturbing substrate's crossing.

Conclusion

We have compared in the figure 5 the severity of the 13 mutations described in this paper with those of frequent and well studied mutations. This classification was based on both *in vitro* and clinical studies. Evaluating severity of these mutations was important to propose accurate genetic counseling as many of them were found in our cohort of 1500 patients with NC (p.R408C in 5 patients, p.I77T in 1 female, p.R341P in 2 females, p.G424S in 3 patients).

Exhaustive clinical and biological data of our cohort were in agreement with *in vitro* studies. Regarding p.G424S and p.R408C, we classified them between SV and SW, p.G424S being more severe than p.I172N whereas residual activity of p.R408C was lower but not null. Only 3 mutations remained more difficult to classify because either phenotype was not informative enough or residual activity was intermediate. Regarding p.R233K, we conclude that it should be severe and thus virilizing. In the same way, the association p.I230T + p.V281L seemed to be potentially severe, deduced from *in vitro* analysis more than phenotype. Finally, regarding p.R369W, residual activity was between p.P30L and p.V281L but phenotypic expression appeared more severe, although no virilization of females was observed so far. All these data emphasize the possible limits of *in vitro* studies in evaluating mutation severity and the importance of having a large cohort of patients with detailed phenotype. Phenotypic expression reflects not only the enzymatic defect but also the steroid metabolism and action.

These reported genotype-phenotype correlations validate the molecular modeling of CYP21. Severe mutations affect key residues for substrate binding (p.I77T), heme binding (p.R354H, p.R408C, p.G424S and p.R426H), catalysis (p.G291S, p.G292D, p.R341P) or folding (p.E320K). The less severe p.R233K and p.R369W affect residues indirectly acting with important domains, being located in helix G for the first and near a residue implicated in redox interaction for the second. The p.I230T is mild despite affecting substrate binding as the severe p.I77T, probably because only disturbing the substrate orientation and not its entrance.

Acknowledgments

We express our sincere gratitude to all the patients included in this study and the clinicians, who sent DNAs with clinical and biological data of the patients: Pr. A Lienhardt-Roussie (1,2,3), Pr A. Tabarin (4) , Pr P.Czernickow (5,34), Pr M. David (6,7,26), Pr J-L Chaussain (8,33) , Dr C. Heinrichs (9), Dr H. Bony-Trifuvonic (10), Dr S.Nivot-Adamiak (11), Dr V. Sulmont (12,20,21), Dr F. Gatelais (13), Dr K. Wagner (14,15), Dr S. Cabrol (16), Pr B.Delemer (17), Dr C. Lecointre (18,19), Pr R. Brauner (22,29,30,45), Dr A. Valade (23), Pr P. Bouchard (24), Dr F. Prieur (25), Dr G. Simonin (27,28), Dr P. Blanc (31), Pr F. Kuttenn (32), Dr M. Bernardin (35), Dr P. Barat (36), Pr G. Theintz (37), Dr Y. Alembik

(38), Pr G. Chabrier (39,47), Dr A. Verloes (40,41), Dr C. Pienkowski (42), Pr D. Dewailly (43), Dr M. Cartigny (44), Dr F. Monceaux (45), Dr A-F. Rueff (46). We are grateful to Dr. B-C Chung for providing cDNA vector, to Dr. W. L. Miller for providing the antihuman CYP21A2 rabbit polyclonal antiserum. We also thank M. Manigand, M. Murena, and A. Favre for technical assistance and Dr. J. Chomilier for bioinformatics assistance.

References

1. **White PC, New MI, Dupont B** 1987 Congenital adrenal hyperplasia (2). N Engl J Med 316:1580-1586
2. **Miller WL, Morel Y** 1989 The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. Annu Rev Genet 23:371-393
3. **Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S** 1988 Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Pediatrics 81:866-874
4. **Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y** 1986 Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. Proc Natl Acad Sci U S A 83:2841-2845
5. **Morel Y, Miller WL** 1991 Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Adv Hum Genet 20:1-68
6. **Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC** 1992 Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Invest 90:584-595
7. **Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinos C, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fekete C, Morel Y, Brauner R** 2003 Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. J Clin Endocrinol Metab 88:2624-2633
8. **Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H** 1994 Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. J Clin Endocrinol Metab 78:1145-1152
9. **Speiser PW, White PC** 2003 Congenital adrenal hyperplasia. N Engl J Med 349:776-788
10. **Lajic S, Levo A, Nikoshkov A, Lundberg Y, Partanen J, Wedell A** 1997 A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. Hum Genet 99:704-709
11. **Krone N, Riepe FG, Grotzinger J, Partsch CJ, Sippell WG** 2005 Functional characterization of two novel point mutations in the CYP21 gene causing simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 90:445-454
12. **Menassa R, Tardy V, Despert F, Bouvattier-Morel C, Brossier JP, Cartigny M, Morel Y** 2008 p.H62L, a rare mutation of the CYP21 gene identified in two forms of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 93:1901-1908
13. **Amor M, Parker KL, Globerman H, New MI, White PC** 1988 Mutation in the CYP21B gene (Ile-172----Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A 85:1600-1604

14. **Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC** 1990 Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. J Biol Chem 265:20916-20922
15. **Hsu LC, Hsu NC, Guzova JA, Guzov VM, Chang SF, Chung BC** 1996 The common I172N mutation causes conformational change of cytochrome P450c21 revealed by systematic mutation, kinetic, and structural studies. J Biol Chem 271:3306-3310
16. **Helmberg A, Tusie-Luna MT, Tabarelli M, Kofler R, White PC** 1992 R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. Mol Endocrinol 6:1318-1322
17. **Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, Wedell A, Luthman H** 1997 Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 82:194-199
18. **Wedell A** 1998 Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): implications for diagnosis, prognosis and treatment. Acta Paediatr 87:159-164
19. **Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP** 2000 Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. J Clin Endocrinol Metab 85:1059-1065
20. **Nikoshkov A, Lajic S, Vlamis-Gardikas A, Tranebjaerg L, Holst M, Wedell A, Luthman H** 1998 Naturally occurring mutants of human steroid 21-hydroxylase (P450c21) pinpoint residues important for enzyme activity and stability. J Biol Chem 273:6163-6165
21. **Nunez BS, Lobato MN, White PC, Meseguer A** 1999 Functional analysis of four CYP21 mutations from spanish patients with congenital adrenal hyperplasia. Biochem Biophys Res Commun 262:635-637
22. **Barbaro M, Baldazzi L, Balsamo A, Lajic S, Robins T, Barp L, Pirazzoli P, Cacciari E, Cicognani A, Wedell A** 2006 Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. J Mol Med 84:521-528
23. **Soardi FC, Barbaro M, Lau IF, Lemos-Marini SH, Baptista MT, Guerra-Junior G, Wedell A, Lajic S, de Mello MP** 2008 Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients. J Clin Endocrinol Metab 93:2416-2420
24. **Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumic M, New MI, White PC** 1991 A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. Mol Endocrinol 5:685-692
25. **Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M, Wedell A, Persson B** 2006 Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. Mol Endocrinol 20:2946-2964
26. **Berman HM, Bhat TN, Bourne PE, Feng Z, Gilliland G, Weissig H, Westbrook J** 2000 The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. Nat Struct Biol 7 Suppl:957-959
27. **Guex N, Peitsch MC** 1997 SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18:2714-2723
28. **Mornet E, Gibrat JF** 2000 A 3D model of human P450c21: study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. Hum Genet 106:330-339
29. **Ravichandran KG, Boddupalli SS, Hasermann CA, Peterson JA, Deisenhofer J** 1993 Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. Science 261:731-736

30. **Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, Arnhold IJ, Mendonca BB** 1998 Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 83:4416-4419
31. **Billerbeck AE, Mendonca BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJ, Bachega TA** 2002 Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. J Clin Endocrinol Metab 87:4314-4317
32. **Giwercman YL, Nordenskjold A, Ritzen EM, Nilsson KO, Ivarsson SA, Grandell U, Wedell A** 2002 An androgen receptor gene mutation (E653K) in a family with congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency as well as in partial androgen insensitivity. J Clin Endocrinol Metab 87:2623-2628
33. **Scott RR, Gomes LG, Huang N, Van Vliet G, Miller WL** 2007 Apparent manifesting heterozygosity in P450 oxidoreductase deficiency and its effect on coexisting 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 92:2318-2322
34. **Gotoh O** 1992 Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. J Biol Chem 267:83-90
35. **Lepesheva GI, Podust LM, Bellamine A, Waterman MR** 2001 Folding requirements are different between sterol 14alpha-demethylase (CYP51) from Mycobacterium tuberculosis and human or fungal orthologs. J Biol Chem 276:28413-28420
36. **Billerbeck AE, Bachega TA, Frazatto ET, Nishi MY, Goldberg AC, Marin ML, Madureira G, Monte O, Arnhold IJ, Mendonca BB** 1999 A novel missense mutation, GLY424SER, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 84:2870-2872
37. **Friaes A, Rego AT, Aragues JM, Moura LF, Mirante A, Mascarenhas MR, Kay TT, Lopes LA, Rodrigues JC, Guerra S, Dias T, Teles AG, Goncalves J** 2006 CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. Mol Genet Metab 88:58-65
38. **Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA, Deisenhofer J** 1995 Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. Structure 3:41-62
39. **Baumgartner-Parzer SM, Schulze E, Waldhausl W, Pauschenwein S, Rondot S, Nowotny P, Meyer K, Frisch H, Waldhauser F, Vierhapper H** 2001 Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Austria: identification of a novel missense mutation. J Clin Endocrinol Metab 86:4771-4775
40. **Tardy V, Forest MG, De Rougemont A, Morel Y** 2005 Detection of heterozygotes for 21-hydroxylase deficiency: Validation of 21-deoxycortisol after ACTH test by sequencing of the entire CYP21 gene In: Horm Res; 64 (suppl 61): 41-42
41. **Johnson EF, Wester MR, Stout CD** 2002 The structure of microsomal cytochrome P450 2C5: a steroid and drug metabolizing enzyme. Endocr Res 28:435-441
42. **Forest MG** 1992 Adrenal Function Tests. In: Ranke M ed. Functional endocrinologic diagnostics in children and adolescents. Tübingen; 248-274

Case	Neonatal screening 17OHP (nmol/l)	Age of diagnosis	Clinical data at diagnosis	17OHP (nmol/l) basal/ACTH	Renin (ng/l) or PRA (ng/ml/h)	Androgen (nmol/l)	Treatment Follow-up	Genotype	Relative activity (%) 17OHP/P
Salt-Wasting form									
1 F	(+) 762	Birth	Prader 4	1056 *(day 3)*	-	-	HC+FC+salt	p.L167P/IVS2-13A/C>G	0.7/0.4
2 M	(+)	Prenatal	-	639 *(day 2)*	52.4 ng/l (day 2)	-	HC+FC+salt	p.L167P/IVS2-13A/C>G	
3 F	(+) 406	Prenatal	Prader 4	279 *(day 1)*	166 ng/l *(day 1)*	T=12.5 Δ4=68	HC+FC+salt	p.L167P/p.L167P	
4 M	nd	Birth	salt wasting	-	-	-	-	p.G291S [(20)]/Large lesion	0.8 (0.4)/ 0.8 (0.4)
5 F	-	Birth	virilization of external genitalia	150	14.2 ng/ml/h	-	-	p.G291S[(20)]/Large lesion	
6 M	nd	Birth	-	1300	100 ng/ml/h	-	HC+FC+salt final height 1.51 m	p.G291S[(20)]/Large lesion	
7M	(+) 274	Birth	salt wasting	786 *(day 7)*	49 ng/ml/h *(day 7)*	-	HC+FC+salt	p.G291S[(20)]/Large lesion	
8 M	(+) 324	Birth	salt wasting	651 *(day 10)*	1095 ng/l *(day 10)*	T=3.5 Δ4=11.9	HC+FC+salt	p.G291S[(20)]/IVS2-13A/C>G	
9 F	nd	Birth	Prader 4 salt wasting	-	-	-	-	p.G292D/large lesion	0.5(0.02)/ 0.7(0.4)
10 F	(+) 85	Birth	Prader 2	150 *(day 9)*	587 ng/l *(day 12)*	-	HC+FC+salt	p.R354H [(21)]/IVS2-13A/C>G	undetectable
11 F	(+) 468	Birth	Prader 3	303 *(day 4)*	165 ng/l *(day 4)*	-	HC+FC+salt	p.R354H[(21)]/p.I172N	

12 F	nd	10 weeks	Prader 1, SW on GEA	453 *(1 y)*	77 ng/l *(1 y)*	T=12.3 Δ4=52.5	HC+FC precocious puberty, final height 1.46/target 1.55	p.R408C[(23)]/p.R408C	1.3/0.6
13 M	(+) 680	Birth	salt wasting	258 *(day 9)*	-	T=9.9	HC+FC+salt	p.R408C[(23)]/p.Q318X	
14 F	?	Birth	Prader 4 salt wasting	450 *(day 3)*	65 ng/l *(day 3)*	T=48 Δ4A=52.5	HC+FC+salt	p.R408C[(23)]/IVS2-13+ promoter	
15 M	?	Prenatal	-	-	-	-	-	p.R408C[(23)]/IVS2-13+ promoter	
Simple-Virilizing form									
16 M	(+) 59	Birth	no salt wasting	203 *(day 12)*	122 ng/l *(day 17)*		HC+FC+salt stop salt	p.I77T[(11)]/Large lesion	3(2)/5(3)
17 F	nd	9y	Prader 1 Menarche	-	-	-	Final height 1.50 HC 10 mg/day	p.I77T[(11)]/704delG	
18 M	nd	10y	BA13/CA 10.8y P4-P5	196.9/369.6 *(10y)*	39 ng/l *(10 y)*	T=5.6	puberty achieved at 11y; HC Final Target height 1.65	p.I77T[(11)]/p.R356W	
19 M	nd	7.6y	BA13/CA 7.6y P2P3	23.3 *(7.6y)*	74 ng/l *(7.6y)*	T=1.8	HC at 7.6y Final = target height 1.65	p.I77T[(11)]/p.R356W	
20 F	nd	3.4y	Prader3; P3 BA8y/CA 3.4y	60.6 *(3.4 y)*	5.6 ng/ml/h *(3.4 y)*	T=6 Δ4A=11.5	HC+FC; Decapeptyl (7.6y) precocious puberty (6.6y) Final = target height 1.57	p.I77T[(11)]/p.R483PfsX57	
21 F	(-)	1y	Prader 1-2	540 *(1 y)*	115 ng/l *(1 y)*	T=3.9 Δ4A=17.5	HC+FC+salt	p.I77T[4]/IVS2-13A/C>G	
22 M	nd	5.6y	PP BA 10y/CA 5y	127 *(5 y)*	-	T=4.2 Δ4A=24.4	HC	p.E320K/p.I172N	4.6(1.8)/ 4.5 (2.6)

23 F	(+) 90.6	day 15	Prader 2	396	1310 ng/l	T 2.1	no salt wasting at day 15 Excellent balance with HC+FC+salt	p.R341P[(22)]/Large lesion	
24 M	nd	6.6y	PP+advanced BA	-	-	-	HC	p.R341P[(22)]/Large lesion	0.7 (0.3)/ 0.7 (0.2)
25 F	nd	5y	Prader4 BA 9y/CA 5y	1500 *(5 y)*	-	T=2.17	Final height 1.47/ Target height 1.57	p.R341P[(22)]/severe intragenic conversion	
26 M	nd	5.8y	PP BA	276 *(5.8y)*	-	-	HC+FC	p.R341P[(22)]/p.Q318X	
27 M	(+) 55	Birth	-	440 *(day 10)*	>320 ng/l *(day 10)*	Δ4A=11.9	HC+FC+salt; Decapeptyl at 10y	p.R341P[(22)]/p.R356W	
28 M	(+) 131	Birth	-	160.6 *(day 15)*	275 ng/l *(day 15)*	Δ4A=16.2	no salt wasting at day 15 HC+FC+salt	p.R341P[(22)]/IVS-13A/C>G	
29 M	(-)	5.1 y	BA 13y/CA 4y	136 *(5.1 y)*	760 ng/l *(5.1 y)*	T=3.1 Δ4A=13.3	Final height= target height 1.78	p.R341P[(22)]/p.R341P	
30 F	(-)	1.8 y	-	81/378 *(1.8 y)*	61 ng/l	T= 1.4	Final Height -0.2SD	p.R341P[(22)]/p.R341P	
31 M	nd	5 y	PP BA	150 under treatment	-	-	-	p.G424S/Large lesion	1.6 (0.4)/ 2 (0.6)
32 F	nd	3M	Prader 3	↑17 urinary cetosteroids ↑pregnantiol	-	-	HC+FC at 2y; menarche at 13y	p.G424S/p.Q318X	
33 F	nd	Birth	Prader 3	244 under treatment	-	T=2.1 under HC+FC	HC+FC	p.G424S/IVS2-13A/C>G+p.P453S	

				HC+FC			2 repairing surgeries		
34 M	(+) 142	Birth	-	246	-	-	HC	p.G424S/IVS2-13A/C>G	
35 F	nd	3y	Prader 1 requiring surgery	520 bad compliance	-	-	HC 1.41	p.G424S/IVS2-13A/C>G	
36 F	(-)	3.4y	Prader 1.P3 BA 7.8y/CA 4.3y	678/926	-	-	HC+FC	p.G424S/p.I172N	
37 M	(+) 212	Birth	-	470 *(day 8)*	> 40 ng/ml/h	Δ4A=48.0	Excellent balance with HC+FC Bone age -0.5DS at 11 years old	p.R426H[(22)]/IVS2-13A/C>G	0.5 (0.6)/ 0.4 (0.2)
38 F	nd	3y	Prader ? requiring surgery hirsutism	66 under treatment HC 30mg+DC 0.5mg		Δ4A=8.4 under tt	HC+FC Final Height 1.65	p.R426H[(22)]/p.I172N	
39 F	nd	-	-	-	-	-	-	p.R426H[(22)]/p.I172N	
40 M	nd	5y	PP AO	-	-	-	HC+FC	p.R426H[(22)]/p.I172N	
41 M	nd	3y	family investigation	-	-	-	HC+FC	p.R426H[(22)]/p.I172N	
42 M	nd	4.4y	BA PP	800	117 ng/l	-	-	p.R426H[(22)]/p.I172N	
Intermediate form									
43 F	nd	9y	Hirsutism, acnea	46/159 *(15y)*	-	T=2.1 Δ4A=14	menarche at 9y; HC+androcur Final Height 1.54	p.R369W/p.Q318X	45.8 (1.8)/ 48.5 (17.2)
44 F	(+) 89	day 30	BA 6y/CA 4.10 y	215 (day 69) 46.6 *(4.10 y)* 33/330 *(5.4 y)*	8.6 ng/ml/h *(4.10 y)*	Δ4A=2.3	HC 5.5y, Decapeptyl 10y, bad compliance Menarche at 12.10y Final height 1.60/Target 1.65	p.R369W/IVS2-13A/C>G	

45 F	(+) 60	day 11	-	63 *(day 11)*	130 ng/l *(day 11)*	T=1.19	GEA leading to death	p.I230T+p.V281L/large lesion	9.4 (6.6)/ 8.5 (5.3)
Non-Classical form									
46 F	nd	17y	Hirsutism dysmenorrhea	34/136 *(17y)*	-	-	Final height 1.51/Target 1.54 Menarche at 14.5y	p.I230T/IVS2-13A/C>G	63.1 (22.3)/ 70.6 (17)

Table 1: Clinical data of the patients

F Female, *M* male, *ND* not done, *BA* bone age, *CA* chronological age; *y* year, *m* month, *d* day; *T* testosterone, *Δ4* androstenedione; *HC* hydrocortisone, *FC* fludrocortisone.
For normal values for steroids see reference (42): for example normative range for 17OHP at the age of 1-2 months is 6.1± 2.4 nmol/l and for Δ4 and T at prepubertal age is < 2 nmol/l
Renin normal values before the age of one year are < 100 ng/l and after the first year range from 15 to 70 ng/l. Plasma renin activity (PRA) normal values are < 22 ng/ml/h before the age of one year and range from 1.9 to 3.7 ng/ml/h after the first year of life.

Relative activity of mutants, expressed as a percentage, is the mean activity in comparison with the wild-type defined as 100%; for mutants tested in repeated experiments, the standard deviation SD is notified in brackets. The SD was not calculated for p.L167P, steroid incubation being different between experiments. In case of mutations with *in vitro* studies previously published, the reference is mentioned in brackets.

Patients 1 and 2 are brother and sister, patients 6 and 7 are cousins as patients 10 and 11; patients 14 and 15 are brother and sister; patients 18 and 19 are brothers; patients 29 and 30 are brother and sister, patients 38 and 39 are sisters, patients 40 and 41 are brothers.
Patients 22, 29 and 30 correspond respectively to patients 66, 64 and 65 of our precedent article (7).

Figures legends

Fig.1. Functional study of the normal protein (WT) and the different mutant human P450c21 (L167P, G292D, G424S, I172N, E320K, R233K, I230T+V281L, P30L, R369W, V281L, I230T) and Kinetic properties of the p.G424S mutant. A-B, CYP21 *in vitro* activity columns represent the relative activities of CYP21 mutants after 1H30 hours of incubation, WT being defined as 100% (a, b). Conversion values are shown for the two natural substrates (17OHP and progesterone) to their corresponding products (11-deoxycortisol and DOC). Values are means of (n) independent experiments with error bars representing 1SD. *Enzyme activity of p.L167P was calculated also for 2h substrates incubation with the same result. C, Apparent Kinetic constants of the p.G424S mutant compared with those of WT and p.I172N.

Fig.2. Immunoblots of CYP21A2 protein expressed in COS-1 cells. The proteins obtained from the different mutants were collected after harvesting cells directly from the well with a lysis buffer. They were detected by rabbit polyclonal antibodies against human CYP21A2 and the intensity of each signal was compared with that of WT.

Fig.3. Multiple amino acids alignments of human CYP21A2 with other mammalian CYP21A2s, mammalian crystallized CYPs or human steroidogenic cytochromes Sequence alignment was performed with CLUSTAL W and edited with GENEDOC. The well conserved amino acids across all P450s are dark-shaded, the less conserved are represented in lighter shades. The mutated residues, indicated with an arrow, are presented in order of decreasing severity, from **A** to **F,** in respect with data of table 1.

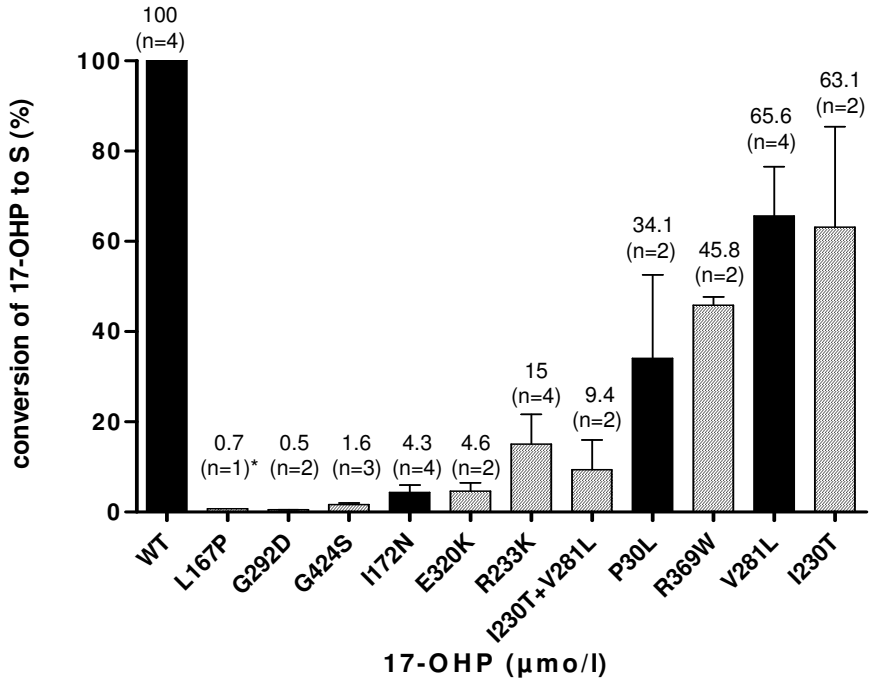
Fig.4. **Molecular modeling of the human P450c21 (A,B,C,D,E,F,G)**: A, Total view of the three-dimensional model structure of CYP21A2, localization of progesterone (green) and heme (red). B, Localization of Leu 167 (purple) in helix E, which directly interacts with helix I. C, Localization of Gly 292 (light pink) close to steroid, heme and other residues involved in catalysis. D, A part of the positively charged residue (-LQPR_{483}G-) (pink) together with negatively charged sequence around the Asp 322 (-EE_{320}LD_{322}H-) (blue) and hydrophobic area of main chain atom residues 446-448 (black) creates a folding nucleus crucial for the initial stages of packing the polypeptide chain. E, Gly 424 (pink) contributes to the formation of the β-hairpin turn of the cysteine pocket. F, localization of Arg 369 (pink) in a sphere of 5 Å containing Glu 380 residue (Blue) involved in redox partner interactions.G, Localization of Ile 230 (red) in a hydrogen network created by bounding of water molecules to several amino acids

including the Ile 230 residue helping substrate's crossing and Arg 233 (yellow) in the helix G involved in the two substrate access channels proposed to connect the surface of the protein to the active site.

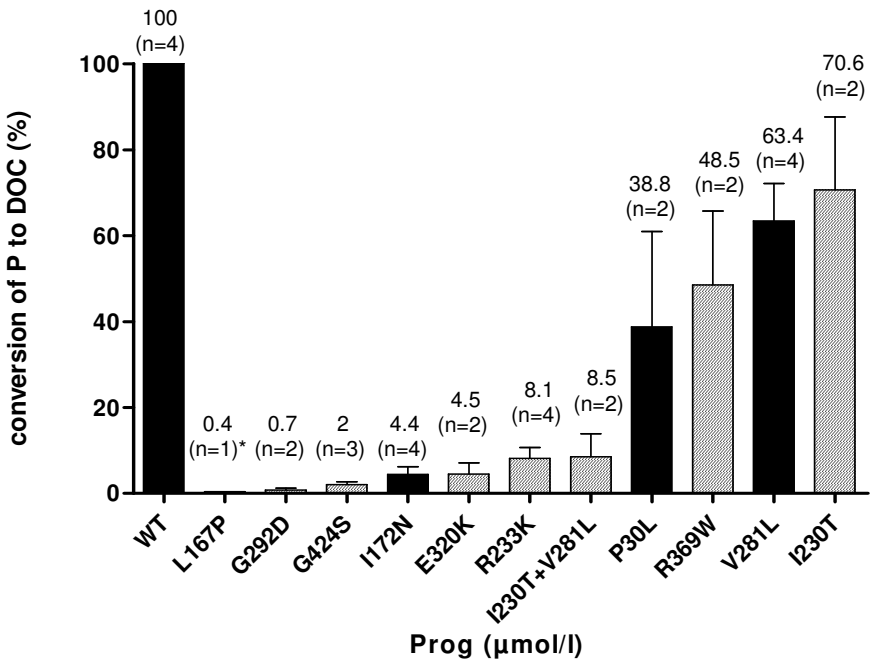
Fig.5. Severity of 13 rare mutations of CYP21A2 deduced from *in vitro* studies and clinical phenotype. Mutations were classified according to functional studies and detailed phenotypical data. Their severity was compared with the known frequent mutations, the mild p.V281L, p.I172N with a low activity sufficient for preventing SW and the null mutation p.Q318X. They were ranged from less severe (on the left of the figure) to more severe one (on the right). Therefore, we classified some mutations as intermediate: p.R369W close to p.V281L whereas the p.I230T+p.V281L and p.R233K were more severe but less than p.I172N. Regarding p.G424S and p.R408C, we concluded that they were on the borderline between p.I172N and null mutations as p.Q318X; p.R408C being more severe than p.G424S.

Figure 1

A



B



C

	17-OHProgesterone		Progesterone	
	Km (µM)	Vmax (pmol.mg^{-1}.min^{-1})	Km (µM)	Vmax (pmol.mg^{-1}.min^{-1})
WT	4.4 ± 0.4	135.1 ± 7.6	0.9 ± 0.2	48.9 ± 3.4
I172N	7.2 ± 5.2	6 ± 2.8	3 ± 1.2	2 ± 0.4
G424S	15.97± 11.9	5.7 ± 3.4	4.4 ± 1.1	3 ± 0.4

Figure 2

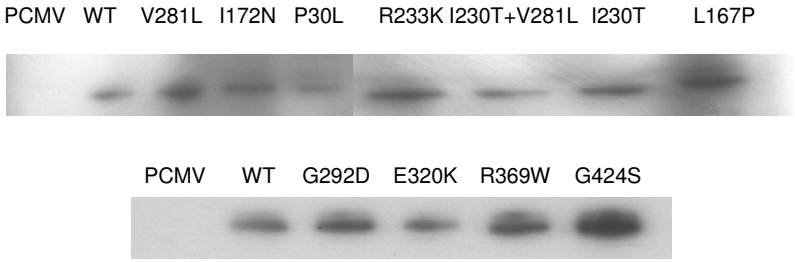

PCMV
WT
V281L
I172N
P30L
R233K
I230T+V281L
I230T
L167P
PCMV
WT
G292D
E320K
R369W
G424S

Figure 3

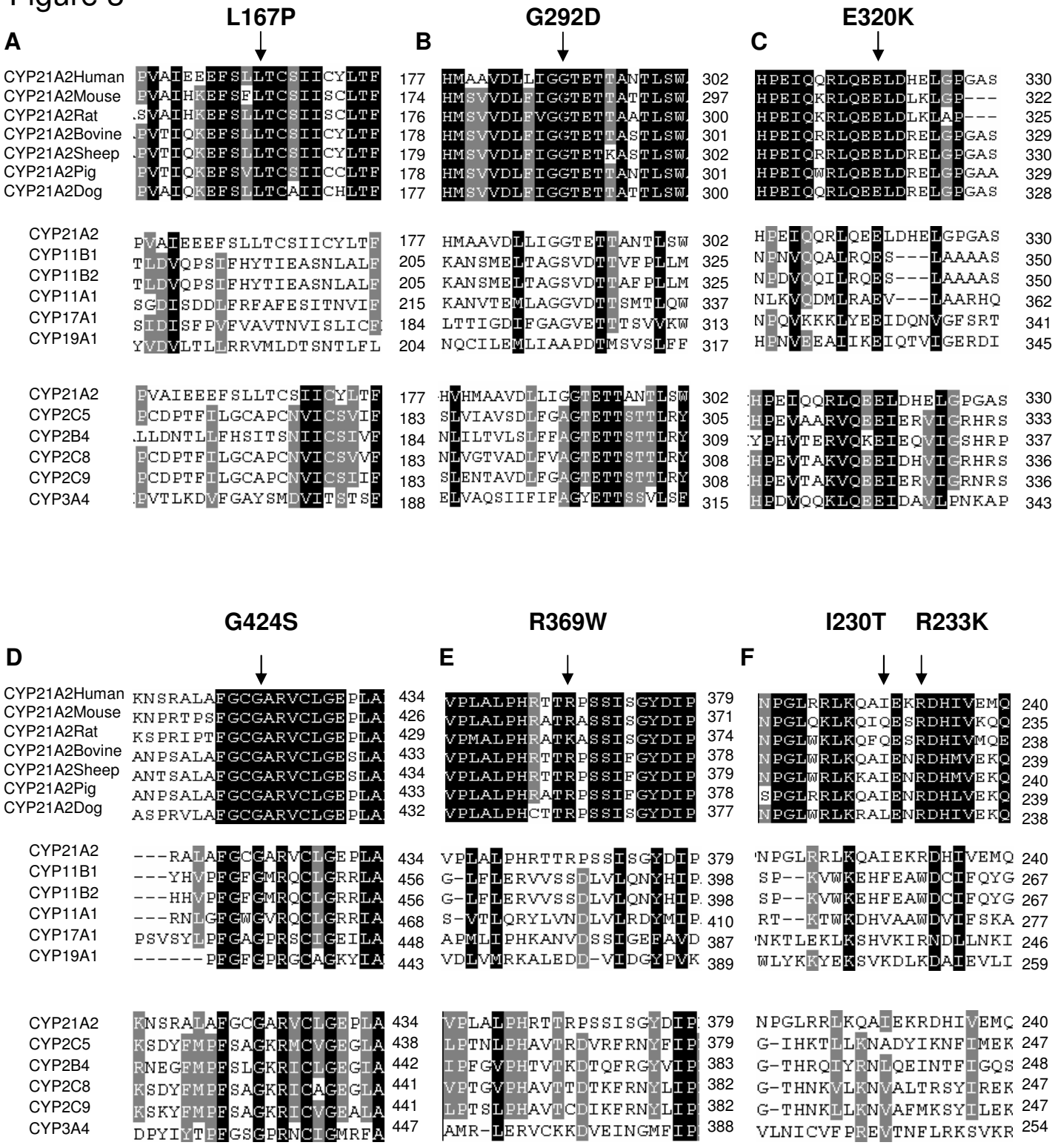
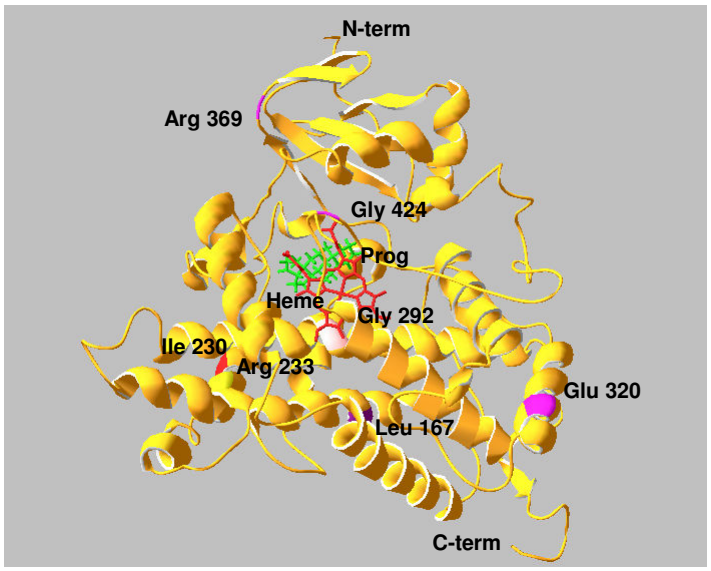
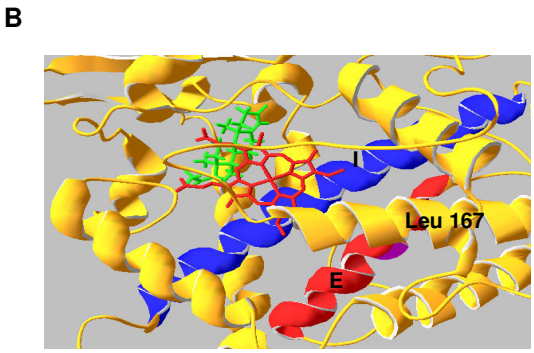
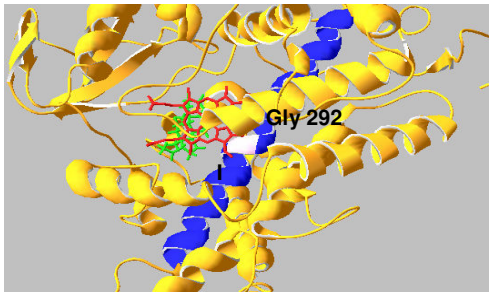
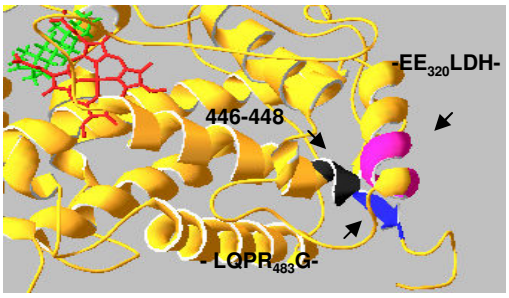

A
L167P
CYP21A2Human
CYP21A2Mouse
CYP21A2Rat
CYP21A2Bovine
CYP21A2Sheep
CYP21A2Pig
CYP21A2Dog
B
G292D
C
E320K
CYP21A2
CYP11B1
CYP11B2
CYP11A1
CYP17A1
CYP19A1
CYP2C5
CYP2B4
CYP2C8
CYP2C9
CYP3A4
D
G424S
E
R369W
F
I230T
R233K

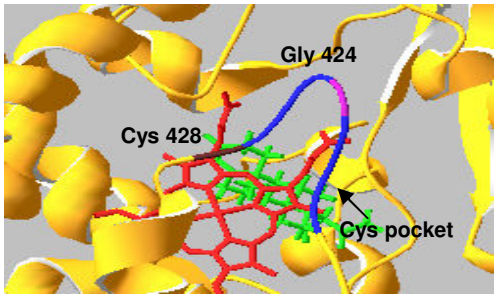
Figure 4

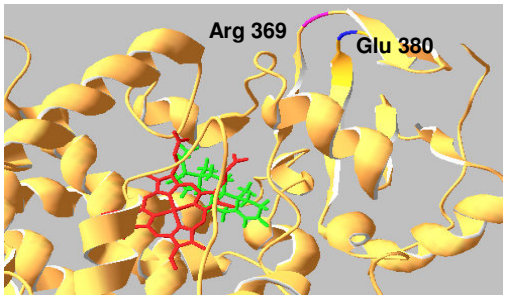

A
N-term
Arg 369
Gly 424
Prog
Heme
Gly 292
Ile 230
Arg 233
Glu 320
Leu 167
C-term


B
I
Leu 167
E


C
Gly 292
I


D
-EE320LDH-
446-448
- LQPR483G-


E
Gly 424
Cys 428
Cys pocket


F
Arg 369
Glu 380

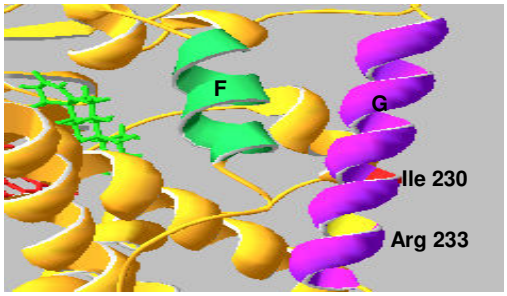
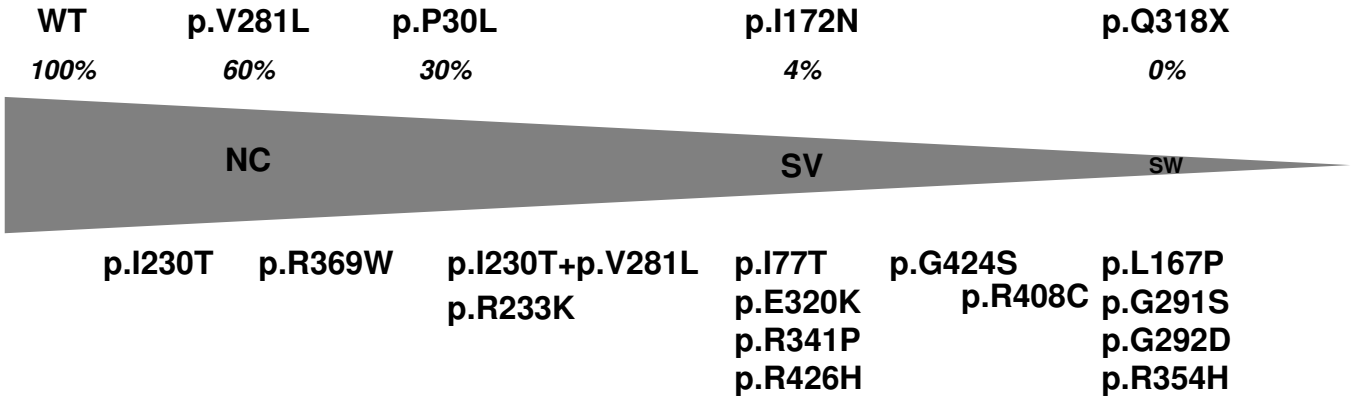

G
F
G
Ile 230
Arg 233

Figure 5


WT
p.V281L
p.P30L
p.I172N
p.Q318X
100%
60%
30%
4%
0%
NC
SV
SW
p.I230T
p.R369W
p.I230T+p.V281L
p.R233K
p.I77T
p.E320K
p.R341P
p.R426H
p.G424S
p.R408C
p.L167P
p.G291S
p.G292D
p.R354H

ARTICLE 3

Three Novels CYP 11B1 mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia due to Steroid 11ß-Hydroxylase deficiency in Moroccan population

Layachi Chabraoui[1], Fatima Abid[1], Rita Menassa[2], Ahmed Gaouzi[3], Aboubaker El hessni[4], Yves Morel[2]

1 Laboratoire de Biochimie (L.C, F.A,), Centre d'étude des maladies héréditaires du métabolisme, CHU ibn Sina, Université Mohammed V Souissi, Rabat, Morocco

2 Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies rare (R.M., Y.M.), Université de Lyon et Centre de biologie et Pathologie Est, Bron, France.

3 Service de Pédiatrie 2 (A. G.) Hôpital d'enfants de Rabat, Morocco.

4 Laboratoire de physiologie nerveuse et endocrinienne (A. E.), Faculté des sciences, Université Ibn Toufail , Kenitra, Morocco

Layachi Chabraoui and Fatima Abid contributed equally to this work and should be considered as an equal first author

Short running title : Three novel CYP11B1 mutations in 11-hydroxylase deficiency

Correspondence should be addressed to:

Professor Yves MOREL
Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares
Centre de Biologie et de Pathologie Est
Centre Hospitalier Est
59, boulevard Pinel
69677 BRON Cedex
FRANCE
Tel: 33 4 72 12 96 83
Fax: 33 4 72 12 97 20
email : yves.morel@chu-lyon.fr

Abstract

Objective: Steroid 11β-hydroxylase deficiency (11β-OHD), the second most common cause of congenital adrenal hyperplasia (CAH), accounts only for 5% of all CAH. To date, only 51 different mutations have been reported with poor clinical and biological data. Most of them could be considered as private mutations. The p.R448H mutation was the most common, identified especially in Moroccan Jews but also in Caucasian patients. As two other CYP11B1 mutations have high incidence in Tunisian patients, we report from another Maghreb population the clinical, follow-up and molecular genetics of 5 Moroccan patients with classical 11β-OHD.

Design and Methods: Five Moroccan patients belonging to three families were recruited on clinical data. The diagnostic was confirmed by 11-deoxycortisol determination. Analyses of the CYP11B1 gene were performed. Molecular modeling was used to evaluate the effect of mutations on 11β-hydroxylase.

Results: Clinical, hormonal and molecular data with molecular modeling of human steroidogenic cytochrome P450 were consistent with a severe form of 11β-OHD. Three novel mutations, p.Ala259Asp, p.Gly446Val and IVS5+2T>G were identified. As each patient was homozygous for one mutation, we could deduce from their phenotype and our modeling studies that p.Gly446Val mutation was more severe than p.Ala259Asp.

Conclusion: This study shows a good correlation between phenotype and genotype of our five patients with classical 11β-OHD. Each mutation of CYP11B1 is new and private, contrasting with the high incidence of two distinct mutations in Tunisian population. The identified mutations have confirmed the diagnosis and allowing genetic counseling.

Introduction

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a family of autosomal recessive disorders caused by an inherited defect in cortisol biosynthesis [1, 2]. Steroid 11β-hydroxylase deficiency (11β-OHD) is the second most common cause of CAH and accounts only for 5% of all CAH according to two old national reports before molecular studies [3, 4]. In our large cohort of about 1700 CAH in which the genetic lesions have been identified, 11β-OHD accounts for 8% of CAH, but its higher incidence could be biased by our recruitment. Recently, the screening of p.R448H mutation in Moroccan Jews [5] estimated a disease incidence of one to 15,000-57,000

births live, lower than the previously reported incidence (1/5000) [6]. Nevertheless, this incidence in North Africa seems higher, especially for the following reasons, the high rate of consanguinity and the absence of early morbidity due to salt-wasting contrasting with 21-hydroxylase deficiency where the ratio girl/boy is elevated [7, 8]. In human adrenal cortex, two 95% identical mitochondrial iso-enzymes, CYP11B1 (also termed P450c11) and CYP11B2 (also termed P450aldosynthase), have an 11β-hydroxylase activity. CYP11B2 is expressed exclusively in the glomerulosa [9]. They are encoded by two genes with identical exon/intron structures, which are located 45 kb apart on chromosome 8q22 [10]. In classical 11β-OHD, mutations of the CYP11B1 gene cause a decrease of the conversion of 11-deoxycortisol to cortisol and result in elevated plasma ACTH levels, overproduction of steroid precursors and subsequent hyperandrogenism. This results in virilisation of the female external genitalia and precocious pseudopuberty (PPP) of both sexes. This CYP11B1 enzyme catalyzes also the conversion of 11-deoxycorticosterone (DOC) to corticosterone in zona fasciculate. In this disorder, elevated plasma DOC, a mineralocorticoïd agonist (10 nmol vs normal values: 0.1-0.6 nmol/L), suppresses early in infancy the renin and the unimpaired biosynthesis of aldosterone and leads to hypertension. The date of appearance of HTA seems variable and poorly documented in literature [11]. To date, 51 different mutations and 3 complex rearrangements leading to a CYP11B2/B1 hybrid gene have been reported in about 100 patients, but clinical and biological data were poor, even absent (HGMD and [12]). Almost all mutations could be considered as private because they have been found in one family except some ethnical mutations [12]. In Moroccan Jews, p.R448H mutation was the most common, but also found in Caucasian patients [13]. Another mutation, p.A379V, was associated with the most of 11β-OHD in Tunisian [14]. The other frequent mutation in Tunisian, p.Q356X mutation, has been also described in other countries, but was associated with black-American and North-African.

Additional studies of 11β-OHD should be performed in other North African populations. The present study describes clinical, follow-up and molecular genetics of 5 patients with classical 11β-OHD. We have not detected the two frequent Tunisian mutations, but we reported three novel, two missense and one splicing mutations in the CYP11B1 gene.

Patients and methods

Patients

Five native Moroccan patients (3 families) have been referred to pediatric consultation of the Rabat Children Hospital in Morocco. Deficiency of 11β-hydroxylase was suspected on clinical ground and confirmed by basal plasma 11-deoxycortisol levels and molecular biology. Informed consent was obtained from the parents of these patients. Table 1 shows a summary of clinical, biological and molecular data. The blood pressure has been evaluated using normal values according to height, sex and age, available at http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/child_tbl.htm.

Family 1. In this large family where the grand-mothers were siblings, three children out 5 were affected. The 46,XX index case (case 1a), assigned as a male at birth, was referred with pseudo-precocious puberty at 5 years old. Pubic hair has been observed at the age of 1 year by the parents. Complete male external genitalia (Prader stage 5) without palpable gonads at examination associated with 46,XX karyotype and high consanguinity (parents were first cousins) have suggested a simple virilizing form of CAH. A high 11-deoxycortisol (667 nmol/L) with undetectable plasma renin activity has confirmed a 11β-OHD. After the beginning of the treatment by glucocorticoïds, a true precocious puberty has occurred with development of breast and cyclic urethral bleeding. The follow-up of this patient was poor because of severe psychosexual difficulties concerning gender identity and behaviour. Decision concerning a gender reassignment or hysterectomy/surgery of mammary glands has been deferred several times. The definitive height was small (141 cm; girl s' height -3,1DS) and the blood pressure remained high (160/120, >99^{th}). The two other affected siblings (Cases 2 and 3) were 46, XY and had a pseudo-precocious puberty at the age of the diagnosis. The blood pressure was respectively at 120/70 (99^{th}/95^{th}, Case 2, 3 years old) and 140/90 (>99^{th}/>99^{th}, Case 3, 18 months old), but was returned to normal levels under treatment, 110/70 (50^{th}/50^{th}, Case 2, 9 years old) and 90/70 (<50^{th}/80^{th}, Case 3, 6 years old). Case 2 had begun a true precocious puberty at 8 years old due to an irregular compliance of treatment.

His height (152 cm) at 9 years old was closed to definitive height. Case 3 had prepubertal testis at 6 years old, but an advanced height (+2,5 DS).

Family 2 : a 46, XX child, assigned as a male at birth, presented at 19 months of age with pubic hair, virilized genitalia (Prader stage 3) and accelerated growth (height: +2DS , bone age: 2 years 8 months) without salt loss. Recently, a definitive decision concerning a gender assignment to male has been taken; hysterectomy and bilateral gonadectomy have been performed at 9 years old. Surgery for hypospadias has been scheduled. The velocity of growth decreased (5y 8m: +2DS to 9y : 0DS) and led to a poor prognosis of final height.

Family 3 : A 3 years 6 months-old boy was referred with pseudo-precocious puberty. Pubic hair (P2) was developed at the age of 18 months. The height (125 cm) was at + 7 DS, bone age was advanced to 13 years giving a height prediction of 147 cm. Blood pressure was very high 170/80 mmHg (>>99^{th}; 120 mmHg correspond to 99^{th} normal value for a 4 years old boy with 99^{th} height). Under treatment, blood pressure have returned progressively to normal values (120/80) but with some high value corresponding to some bad compliance (140/80 mmHg at 4years 6 months old). Nevertheless, blood pressure has remained in upper limit values (130/nd). The definitive height was 137 cm. The parents were first cousins.

Methods

Hormonal assays

11-deoxycortisol was measured by RIA after separation on a celite column (SI unit conversion : 11-deoxycortisol : ng/ml x 2, 88 = nmol/L).

DNA analysis and sequence analysis of the CYP11B1 gene

Peripheral blood was sampled from patients and parents after informed consent. The CYP11B1 gene was amplified by PCR in three specific fragments using at least one primer specific of the CYP11B1. The set of primers for each fragment were: 5'UTRexon1-intron2 fragment (sense: 5'TACCCAGTAGTCATTCAGGA3', specific for CYP11B1; antisense: 5'CCACGGAATGGCCGTCCTCT3', no specific); intron2-intron5 (sense: 5'TAGACCTGAGTGGCCTTTGTC3', weakly specific; antisense: 5'CCAAGACTTCAAATCCTAATGC3', specific); intron5-3'UTRexon9 (sense: 5'GGGGTTTGGATGGGCATTAGGAT3', specific; antisense: 5'TGGGGCTGGGGACAAGGTCAGCAA3', specific). Fragment sizes for these three

segments were 1379 bp, 1423 bp and 1894 bp, respectively. PCR program using touchdown technique and primers for sequencing are available on request. PCR and sequencing products were purified using the Millipore sustem (Billerica,MA). Sequencing products were run on ABI Prism Genetic analyzer 3130.xl (applied Biosystems, Foster City, CA).

Sequence alignment and molecular modeling

As recent reports have used molecular modeling of human steroidogenic cytochrome P450 to evaluate the consequence of mutations in the 21-hydroxylase [15] and 11-hydroxylase[16, 17] deficiencies, we performed a BLAST search in the UNIPROT using the CYP11B1 amino acid sequence (P15538) as a template. These homologous sequences were aligned together with Clustal W [18](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/), displayed and edited using Genedoc (http://www.psc.edu/biomed/genedoc).

The alignment of human CYP11B1 was performed with three groups of cytochromes: a) CYP11B1s of different species: bovine, sheep, pig, rat and mouse; b) mammalian crystallised cytochromes: human CYP2C9, human CYP2C8, rabbit CYP2C5, rabbit CYP2B4 and human CYP3A4; c) other human steroidogenic P450 cytochromes: CYP11B2, CYP11A1, CYP17, CYP21, CYP19.

The model used for our study was the human CYP11B1. A molecular model was calculated based upon the structure of rabbit cytochrome CYP2C5 (27) at 2.3 Å resolution and with an R-value of 0.257 (PDB accession no. 1N6B) using the program swiss pdb viewer v3.7 (http://www.expasy.org/spdbv). The sequence identity is 26% and sequence similarity 47% on the aligned part of the chain. The quality of the model was evaluated using several methods. Anolea method, which performs energy calculations on a protein chain, evaluates the "**N**on- **L**ocal **E**nvironment" (NLE) of each heavy atom in the molecule [19, 20]. The energy of each pairwise interaction in this non-local environment is taken from a distance-dependent knowledge-based mean force potential that has been derived from a database of 147 non-redundant protein chains with a sequence identity below 25% and solved by X-Ray crystallography with a resolution lower than 3 Å. Another evaluation method, Verify3D to analyze the compatibility of an atomic model (3D) with its own amino acid sequence (1D). Each residue is assigned a structural class based on its location and environment (alpha, beta, loop, polar, nonpolar, etc). A collection of good structures is used as a reference to obtain a score for each of the 20 amino acids in this structural class. The scores of a sliding 21-residue window (from -10 to +10) are added and plotted for individual residues [21]. GROMOS, empirical force field energy for each amino acid of the protein chain, was also used [22]. It is

useful to look at the Ramachandran plot in which the model has only 16 nonglycine outliers compared with five for the template crystal structure. Thus, we consider the CYP11B1 model to be of appropriate quality for the investigations in this study.

The program "Swiss pdb viewer v3.7" was also used to determine the different domains of the protein (heme group binding, steroid binding, redox partner interaction) as previously described [15].

Results

Identification of three new mutations in the CYP11B1 gene

As clinical and hormonal data of these five patients in the three unrelated families were consistent with a severe form of 11-hydroxylase deficiency, a direct sequencing of the CYP11B1 gene has been performed (Fig. 1). In family 1, a G to T substitution at 1337 nucleotide (c.1337G>T) in exon 8 changed codon 446, GGC, encoding glycine, to GTC, valine (p.Gly446Val). All three affected patients of this family were homozygous for this mutation. In family 2, a homozygous C to A substitution at 776 nucleotide (c.776C>A) in exon 4 changed Codon 259, GCC, encoding alanine, to GAC, aspartic acid (p.Ala259Asp). In family 3, an intronic T to G substitution was identified at the second nucleotide of highly conserved splice donor site of the intron 5 (IVS5+2T>G, termed also c.954+2T>G). In each family, both parents were confirmed to be heterozygous for the corresponding mutation. To our knowledge, these mutations have not been previously reported in patients with 11-hydroxylase deficiency. As all patients were homozygous for each of these three CYP11B1 mutations and have a severe form of 11-hydroxylase deficiency, these mutations should abolish all 11-hydroxylase activity.

Discussion

In this study, we report clinical, follow-up and CYP11B1 mutations of 5 patients with 11-OHD in three arab families from Morocco. The diagnosis of 11-OHD has been done late in infancy between 18 months and 3 years of life as about 60% of the reported cases [12]. Clinical phenotypes at age of diagnosis were severe with ambiguous genitalia in girls and precocious pseudopuberty in boys. The two 46,XX patients have been assigned as boy at birth because of severity of virilization and reared as boy in childhood. A similar pattern was observed in another Arab population [27]. Seven of thirteen 46,XX patients of Saudi Arabia were reared as male. All patients present a hypertension at age of diagnosis except the index case

homozygous for p.A259D. Severity of hypertension has been well defined because the values were compared to height age-appropriate norms. In all cases, a decrease of the blood pressure is observed and dependent of a good compliance of the treatment. In all previously reported 11-OHD confirmed by molecular biology (see review [12]), hypertension was rarely reported during the second year of life, but more often later although few blood pressure values have been compared to appropriate norms. The absence of salt wasting (SW) in our patients diagnosed late supports that the diagnosis of 11-OHD should be eliminated in SW CAH. In our experience, we have never found CYP11B1 mutations in a suspected 11-OHD with SW. Compared to 21-OHD where the degree of salt loss correlates well with the severity of the defect, clinical criteria of 11-OHD severity are more accurate if the diagnosis has been done later after the first year of life. Androgen excess-dependent signs as *in utero* virilisation and the onset of pseudo precocious puberty are good criteria but no pure because they depend no only of the defect but also to the androgen metabolism and sensitivity.
Therefore it was common to report that there were no good correlation between a specific mutation and the clinical phenotype because the authors compared some criteria variable at the time of diagnosis as hypertension and virilisation in male [6, 9, 28]. Nevertheless, biological data as increased 11-deoxycortisol and renin values correlate better with the severity of the defect. In our patients, hypertension and biological data appears the best criteria of severity.

We reported three novel mutations of CYP11B1 gene, p.Ala259Asp, p.Gly446Val and IVS5+2T>G. Each mutation of CYP11B1 is new and private, and did not correspond with the two mutations having high incidence in Tunisian population[14]. Our splicing mutation, IVS5+2T>G or c.954+2T>G, was located in a splice donor site as the five different splice mutations previously described in 11-OHD [12, 29-32]. The IVS5+2T>G mutation, modifying one of the two canonical nucleotides of the donor site, universally conserved in mammals, was predicted to cause aberrant splicing due to the disruption of interactions with small RNA and snRNP, especially U1 snRNP.

Three mutations occurred in the exon5/intron5 junction and changed two of the three most conserved nucleotides of the human 5' splice donor consensus sequence (G/GT; 80%/100%,100%)[33]. One, IVS5+1G>A or c.954+1G>A changed the first nucleotide G of an intron[12, 30], the two others, c.954G>A or c.954G>C, the last nucleotide of the exon[31, 32]. As previously reported by us, this last mutation caused an aberrant splicing with an undetectable mRNA due to non sense-mediated decay (NMD) although it did not change the threonine at

position 318[31]. As the others, this homozygous mutation should cause an aberrant splicing and no CYP11B1 protein and correlate well with the severe phenotype of our patient.
For the two missense mutations described in this paper, the degree of severity could be deduced from our molecular modeling but also from clinical and biological data because each patient is homozygous for a mutation. Thus, we have performed structural alignment of the amino sequence of CYP11B1 with multiple cytochromes: human P450 enzymes involved with the biosynthesis of steroids, especially two other mitochondrial cytochromes, CYP11B2 and CYP11A1, and three microsomal P450 (CYP21, CYP17 and CYP19); another alignment with CYP11B1 of other species was also performed.

Gly446 is strictly conserved in all other steroidogenic and mammalian cytochromes (Fig. 2). The heme of P450s is covalently bound to the sulfydryl of the invariant cysteine found in a β-bulge region called the Cys-pocket (Fig.3A and 3C). This Cys-pocket could maintain the cysteine in a hydrophobic environment and contains three conserved residues besides the cysteine, **F**XX**G**$_{446}$XRX**C**X**G**. Two of these are glycines: the one, Gly446, allows the formation of the β-hairpin turn; the other, Gly452, serves two roles, allowing for a sharp turn from the Cys-pocket into the L helix and for proximity to the heme. The third conserved residue is a phenylalanine that is quite close to the sulphur-iron bond of the heme [23]. Therefore, Gly446 is essential for the binding of the Cysteine 450 to the heme by allowing formation of the β-hairpin turn and the replacement by valine should disturb the formation of this sharp turn because valine with its side chain is less flexible than the small glycine resulting in a severe decrease of CYP11B1 activity. This hypothesis is supported by the severity of the defect of the three patients carrying this mutation. Other mutations changing amino acid residue in this Cys pocket has been reported. Two mutations change Arg448, which forms a H-bond with one heme propionate [34] and completely abolishes 11β-hydroxylase activity. The one, pR448H, is the most frequent found in almost all affected alleles (23 alleles) of Moroccan Jews[5, 13] but also in Caucasian patients (7 alleles)[35, 36], the other, p.R448C, is rare (2 alleles)[5, 35]. Another mutation, p.G444D, modifies a Gly conserved in CYP11B1 species and steroidogenic cytochromes but not with other cytochromes, decreases 11β-hydroxylase activity[37].

Finally, our third new mutation, p.A259D, changes Ala259 residue in aspartic acid. This residue is highly conserved at this position in mitochondrial cytochromes and aromatase, less conserved in the others but replaced by a polar not charged amino acid except for 21-hydroxylase where it is replaced by a basic lysine (Fig. 2). According to our modeling of

CYP11 B1, Ala259 is located in the helix G near residues 255-264 and Ser308 (I-helix) (<5A°) (Fig 3A and 3B). This type of mutation was studied in the 21-hydroxylase by Robins et al.[24]. The helix G is essential for the initial substrate recognition and for substrate access to channels. Then, two different substrate access channels connecting the surface of the protein to the active site have been proposed for CYP2C5 [25, 26]. The first putative access channel is located between F and G helices, and the second one is suggested by the relatively loose packing of the B-C loop with helices G and I. The replacement of the non polar amino acid, alanine, by the acid hydrophilic residue, aspartic acid, could theoretically disrupt the hydrophobic environment, resulting in disturbed enzyme function by impairing its interaction with the steroid substrate.

No mutation has been already identified in this region in 11-OHD. As Ala259 corresponds to Glu232 after alignment with CYP21A2, a comparison could be done with the cluster E6, consisting of a three amino acid substitutions (p.I236N, p.V237E, p.M239K) in helix G of CYP21, representing 1% mutation in classical 21-OHD and has been extensively studied by Robins et al[24]. In vitro functional studies of each mutation have demonstrated that only two were deleterious; p.V237E abolished all activity and pI236N had a residual activity of 2%. As the 46,XX patient, homozygous for p.A259D, has a classical form with in utero virilisation (stage 3) but blood pressure between 60th and 90th, we suggest that this mutation is less severe than G446V.

This study shows a good correlation between phenotype and genotype of our five patients with classical 11β-OHD. Each mutation of CYP11B1 is new and private, contrasting with the high incidence of two mutations in Tunisian population. The identified mutations have confirmed the diagnosis and allowed a safe genetic counseling.

Figure legends

Figure 1. Mutation analysis of the CYP11B1 gene in three Moroccan families. The CYP11B1 gene and the localization of the novel mutations are showed (at the top). For each family, a pedigree tree, normal (WT) and homozygous mutated sequences of the CYP11B1 gene are shown. For family 3, the boundary of the junction between exon 5 and intron 5 is shown on the sequence by vertical dotted lane.

Figure 2. Multiple amino acids alignments of human CYP11B1 with other mammalian CYP11B1s, human steroidogenic cytochromes or mammalian crystallized CYPs. Sequence alignment was performed with CLUSTAL W and edited with GENEDOC. The dark-shaded regions represent the amino acids conserved across all P450s in alignment and lighter shades represent lesser levels of similarity according to Genedoc. The mutant residues are indicated with an arrow in human CYP11B1. Accession numbers for CYP11B1 protein sequences are: human CYP11B1 (Uniprot P15538), bovine (Uniprot P15150), sheep (Uniprot P51663), pig (Uniprot Q29552), rat (Uniprot P15393) and mouse (genebank NP_001028401.1); b) for mammalian crystallised cytochromes: human CYP2C9 (Uniprot P11712), human CYP2C8 (Uniprot P10632), rabbit CYP2C5 (Uniprot P00179), rabbit 2B4 (Uniprot P00178) and human CYP3A4 (Uniprot P08684); c) and for other human steroidogenic P450 cytochromes: CYP11B2 (Uniprot P19099), CYP11A1 (Uniprot P05108), CYP17 (Uniprot P05093), CYP21 (Uniprot P08686), CYP19 (genebank NP_112503.1).

Figure 3. Molecular modeling of the human CYP11B1.A,Total view of the three-dimensional model structure of CYP11B1; localization of the heme (red) and Cys-pocket (pink).B, Localization of the A259 in the G-helix essential for the initial recognition of substrate. Amino acids near A259 (in black, < 5 A°): S308 (I-helix) and residues 255-264 (G-helix).C, Localization of the G446 in the Cys-pocket, a β-bulge region that envelops the cysteine in a hydrophobic environment. The G446 is in position that allows the formation of the β-hairpin turn of this Cys-pocket.

Acknowledgements

We would like to thank the patient's families for their cooperation, Françoise Ploye for her technical help, Prof. Alaoui Idriss, Pr. laila.Chabaa, Dr. Habiba Talbaoui, Dr. Saloua Dahri, Dr. Abdellah Benslimane and all the pediatricians who contributed to this work. Prof. Ahmed Alaoui, professor of English linguistics and president of institute of languages, for the English proofreading of this article.

References

1. New M, White P, Pang S, Dupont B & Speiser P. The adrenal hyperplasias. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, pp 1881-1917. Eds C Scriver, A Beaudet, W Sly & D Valle. New York: McGraw-Hill, 1989.
2. Morel Y, Bertrand J & Rappaport R. Corticoids: Disorders of hormonosynthesis. In *Pediatric Endocrinology*, edn 2nd, pp 305-332. Eds J Bertrand, R Rappaport & P Sizonenko. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993.
3. Werder EA, Siebenmann RE, Knorr-Murset G, Zimmermann A, Sizonenko PC, Theintz P, Girard J, Zachmann M & Prader A. The incidence of congenital adrenal hyperplasia in Switzerland--a survey of patients born in 1960 to 1974. *Helv Paediatr Acta* 1980 **35** 5-11.
4. Bois E, Mornet E, Chompret A, Feingold J, Hochez J & Goulet V. L'hyperplasie congénitale des surrénales (21-OH) en France. *Arch Fr Pédiatr* 1985 **42** 175-179.
5. Paperna T, Gershoni-Baruch R, Badarneh K, Kasinetz L & Hochberg Z. Mutations in CYP11B1 and Congenital Adrenal Hyperplasia in Moroccan Jews. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 **90** 5463 - 5465.
6. Rosler A, Leiberman E & Cohen T. High Frequency of Congenital Adrenal Hyperplasia (Classic 11beta-Hydroxylase Deficiency) Among Jews from Morocco. *Am J Med Genet* 1992 **42** 827-834.
7. Kharrat M, Tardy V, M'Rad R, Maazoul F, Jemaa LB, Refai M, Morel Y & Chaabouni H. Molecular genetic analysis of Tunisian patients with a classic form of 21-hydroxylase deficiency: identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 **89** 368-374.
8. Abid F, Tardy V, Gaouzi A, El Hessni A, Morel Y & Chabraoui L. CYP21A2 gene mutation analysis in Moroccan patients with classic form of 21-hydroxylase deficiency: high regional prevalence of p.Q318X mutation and identification of a novel p.L353R mutation. *Clin Chem Lab Med* 2008 **46** 1707-1713.
9. White PC, Curnow KM & Pascoe L. Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes. *Endocr Rev* 1994 **15** 421-438.
10. Mornet E, Dupont J, Vitek A & White PC. Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *J Biol Chem* 1989 **264** 20961-20967.
11. Nimkarn S & New MI. Steroid 11beta- hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol Metab* 2008 **19** 96-99.
12. Bhangoo A, Wilson R, New MI & Ten S. Donor splice mutation in the 11beta-hydroxylase (CypllB1) gene resulting in sex reversal: a case report and review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006 **19** 1267-1282.
13. White PC, Dupont J, New MI, Leiberman E, Hochberg Z & Rosler A. A mutation in CYP11B1 (Arg-448----His) associated with steroid 11 beta- hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin. *J. Clin. Invest.* 1991 **87** 1664-1667.
14. Chaabouni H, Menassa R, Maazoul F, Bochra F, Myrvat K, Maha K, Ben Jemaa L, M'Rad R & Morel Y. 11beta-hydroxylase deficiency in Tunisia only due to two mutations of the CYP11B1 gene: A379V, a novel and Q356X. *Horm Res* 2005 **64, S1** 336-337.
15. Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M, Wedell A & Persson B. Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Mol Endocrinol* 2006 **20** 2946-2964.
16. Krone N, Grischuk Y, Muller M, Volk RE, Grotzinger J, Holterhus PM, Sippell WG & Riepe FG. Analyzing the functional and structural consequences of two point mutations (P94L and A368D) in the CYP11B1 gene causing congenital adrenal

hyperplasia resulting from 11-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 **91** 2682-2688.

17. Krone N, Riepe FG, Gotze D, Korsch E, Rister M, Commentz J, Partsch CJ, Grotzinger J, Peter M & Sippell WG. Congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase deficiency: functional characterization of two novel point mutations and a three-base pair deletion in the CYP11B1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 **90** 3724-3730.
18. Thompson JD, Higgins DG & Gilbson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research (online)* 1994 **22** 4673-4680.
19. Melo F & Feytmans E. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *J Mol Biol* 1998 **277** 1141-1152.
20. Melo F, Devos D, Depiereux E & Feytmans E. ANOLEA: a www server to assess protein structures. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 1997 **5** 187-190.
21. Bowie JU, Luthy R & Eisenberg D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 1991 **253** 164-170.
22. van Gunsteren WF, Dolenc J & Mark AE. Molecular simulation as an aid to experimentalists. *Curr Opin Struct Biol* 2008 **18** 149-153.
23. Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA & Deisenhofer J. Structure and function of cytochromes p450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* 1995 **3** 41-62.
24. Robins T, Barbaro M, Lajic S & Wedell A. Not all amino acid substitutions of the common cluster E6 mutation in CYP21 cause congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 **90** 2148-2153.
25. Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF & McRee DE. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell* 2000 **5** 121-131.
26. Johnson EF, Wester MR & Stout CD. The structure of microsomal cytochrome P450 2C5: a steroid and drug metabolizing enzyme. *Endocr Res* 2002 **28** 435-441.
27. Aljurayyan NAM. Congenital adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency in saudi arabia: clinical and biochemical characteristics. *Acta Paediat* 1995 **84** 651-654.
28. Zachmann M, Tasinari D & Prader A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 ß hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1983 **56** 222 - 229.
29. Hampf M, Dao NT, Hoan NT & Bernhardt R. Unequal crossing-over between aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase genes causes congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 **86** 4445-4452.
30. Merke DP, Tajima T, Chhabra A, Barnes K, Mancilla E, Baron J & Cutler GB. Novel CYP11B1 mutations in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 beta-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 **83** 270-273.
31. Chabre O, Portrat-Doyen S, Chaffanjon P, Vivier J, Liakos P, Labat-Moleur F, Chambaz E, Morel Y & Defaye G. Bilateral laparoscopic adrenalectomy for congenital adrenal hyperplasia with severe hypertension, resulting from two novel mutations in splice donor sites of CYP11B1. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 **85** 4060-4068.
32. Skinner CA, Rumsby G & Honour JW. Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis for the detection of mutations in the CYP11B1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 **81** 2389-2393.

33. Buratti E, Chivers M, Kralovicova J, Romano M, Baralle M, Krainer AR & Vorechovsky I. Aberrant 5' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic Acids Res* 2007 **35** 4250-4263.
34. Belkina NV, Lisurek M, Ivanov AS & Bernhardt R. Modelling of three-dimensional structures of cytochromes P450 11B1 and 11B2. *J Inorg Biochem* 2001 **87** 197-207.
35. Geley S, Kapelari K, Johrer K, Peter M, Glatzl J, Vierhapper H, Schwarz S, Helmberg A, Sippell WG, White PC & Kofler R. CYP11B1 mutations causing congenital adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 **81** 2896-2901.
36. Sido AG, Weber MM, Sido PG, Clausmeyer S, Heinrich U & Schulze E. 21-Hydroxylase and 11{beta}-Hydroxylase mutations in Romanian patients with classic congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 **90** 5769-5773.
37. Motaghedi R, Betensky BP, Slowinska B, Cerame B, Cabrer M, New MI & Wilson RC. Update on the prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 11beta-hydroxylase deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005 **18** 133-142.

Case	1a	1b	1c	2	3
Caryotype	46,XX	46,XY	46,XY	46,XX	46,XY
Assignement	male at birth reared as boy	male	male	male at birth reared as boy	male
Age of diagnosis	5 years	3 years	18 months	19 months	18 months
Clinical data at age of diagnosis	Prader stage 5	PPP	PPP	Prader stage 3 Pubic hair	PPP
Height (DS)	115 cm (+2DS)	118 cm (+6DS)	89 cm (+3DS)	85 cm (+2DS)	nd
Bone age	nd	8y	nd	2y 8m	nd
Potassium, (mmol/L)					
Blood pressure					
• at age of diagnosis	severe	120/70 (99th/95th)	140/90 (>99th)	95/60 (60th/90th)	nd
• during the follow-up	150/90 (5y)(>99th) 160/120 (10y) (>99th)	130/70 (4y5m)(>99th) 100/60 (5y)(90th) 110/70 (9y)(50th)	110/70 (2y9m)(90th) 80/50 (3y3m)(50th) 90/70 (6yr)(50th/80th)	85/50 (4y)(90th/50th)	170/80 (3y6m)(>>90th) 140/80 (4y7m)(>99th/99th) 117/73 (6y10m)(90th)
11-deoxycortisol (nmol/L)	667	nd	nd	545	124
Plasma renin activity (pmol/l/s)	<0.02	nd	nd	0.02	nd
Genotype (homozygous mutation)	p.G446V	p.G446V	p.G446V	p.A259D	IVS5+2T>G

Hormonal data were measured at the diagnosis.

F Female, *M* male, *nd* not done; *BA* bone age, *CA* chronological age; *y* year, *T* testosterone, *Δ4* androstenedione

PPP precocious pseudo puberty

For blood pressure, normal values according to height, sex and age were available at http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/child_tbl.htm

Table 1: Clinical data of patients

Figure 1:

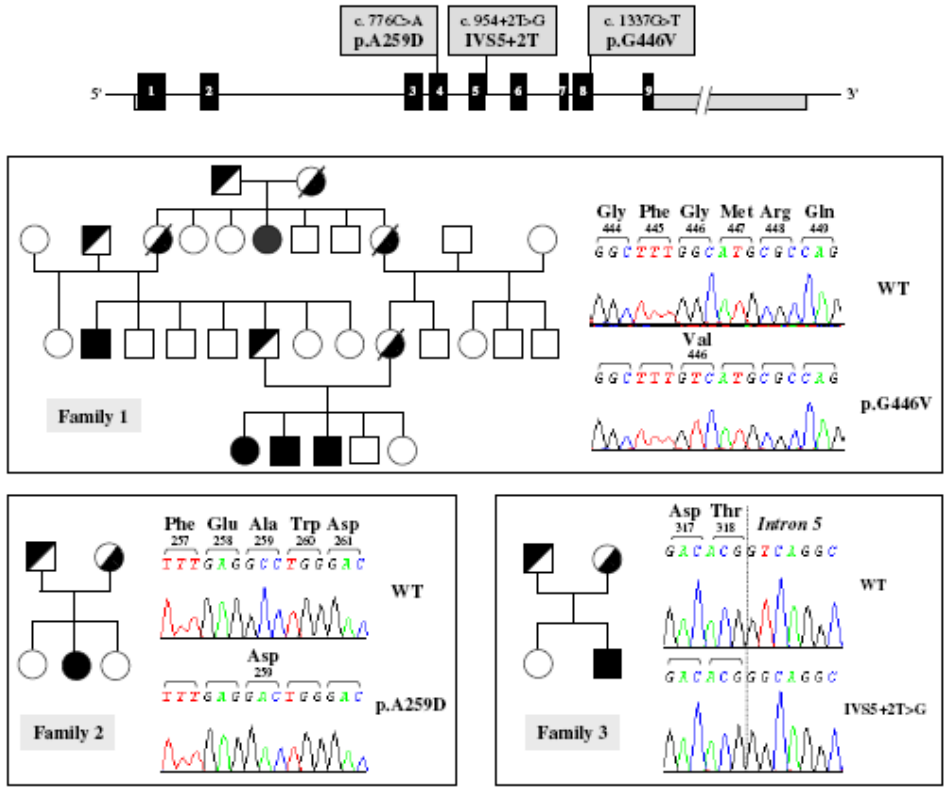


Figure 2:

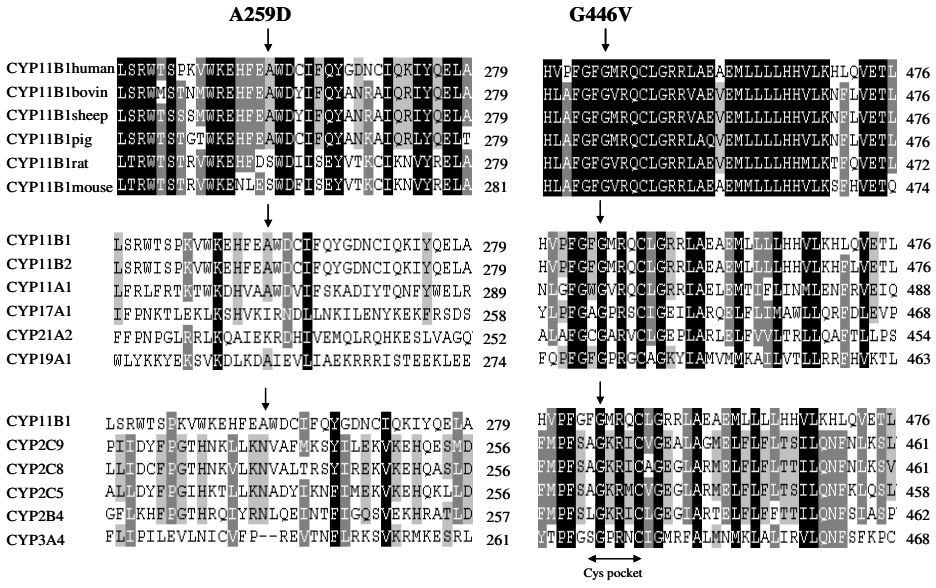
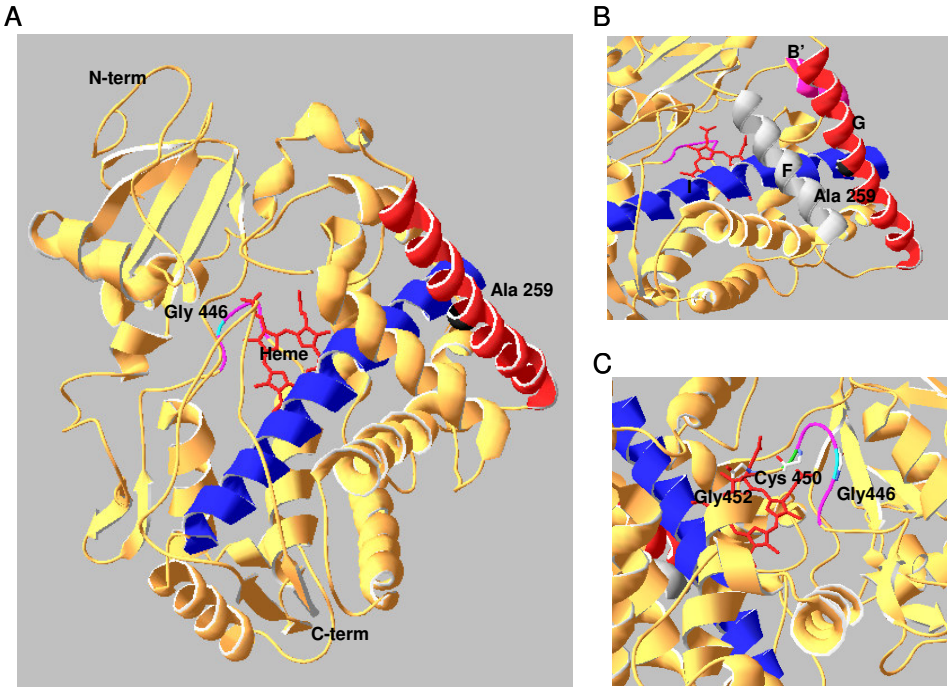


Figure 3:


A
N-term
Ala 259
Gly 446
Heme
C-term
B
B'
G
F
Ala 259
C
Cys 450
Gly452
Gly446

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les relations entre le génotype et le phénotype sont évaluées par une analyse complète des données clinico-biologiques et des études *in vitro* des nouvelles mutations identifiées chez les patients. Les résultats obtenus confirment une bonne corrélation génotype/phénotype. Les études fonctionnelles sont étendues pour comparer l'activité enzymatique résiduelle avec le degré de symptomatologie.

Des études cinétiques sont réalisées dans un second temps pour affiner les études semi-quantitatives réalisées et avoir une idée sur le mécanisme du déficit enzymatique. Les mutants qui touchent le domaine de liaison au substrat ont toujours un Km augmenté et un Vmax diminué.

Les résultats obtenus supportent le fait que les études fonctionnelles sont valables pour séparer les différents mutants en fonction de leur sévérité. Ils démontrent de la même façon que les analyses *in vitro* permettent la discrimination entre polymorphisme et mutation et la détermination de la sévérité d'une mutation identifiée chez un patient hétérozygote composite pour une nouvelle mutation sur un allèle et une autre modérée sur l'autre allèle déterminant la sévérité *in vivo*.

Ainsi, dans quelques situations, le diagnostic clinique ne fournit pas systématiquement des informations suffisantes pour classer les nouvelles mutations identifiées chez les patients. Ceci est le cas des hétérozygotes composites et des garçons atteints de la forme intermédiaire entre SV et NC. Ceci est le cas aussi des nouveaux-nés dépistés à la naissance avant l'apparition des symptômes. L'investigation de ces nouvelles mutations fournit des informations ayant une implication directe pour le diagnostic, le conseil génétique et la prise en charge des familles chez lesquelles de nouvelles mutations ont été identifiées.

Les études fonctionnelles sont longues et laborieuses, ne permettant pas de fournir des informations rapides sur la sévérité d'une nouvelle mutation identifiée chez un patient. Ceci nous a conduit à développer des techniques bioinformatiques comme outil de prédiction des conséquences des nouvelles mutations avant de réaliser les études *in vitro*. Les études structurales du modèle CYP21 avec tous les mutants faux-sens sont construites et chaque variant est évalué en étudiant différents paramètres: conservation de l'acide aminé, calcul d'énergie, changement de classes d'acides aminés, distance à l'hème et au stéroïde, informations structurales déduites de l'inspection visuelle du modèle. De bonnes corrélations ont été trouvées

entre ces paramètres et les manifestations cliniques des mutations, indiquant une bonne fiabilité de cette approche.

En conclusion, une combinaison d'informations déduites des études fonctionnelles et structurales des différents mutants du gène CYP21 a permis de définir la fonction de plusieurs régions de ce cytochrome, expliquant ainsi les mécanismes par lesquels les différentes mutations altèrent l'activité enzymatique.

Perspectives

Le travail rapporté dans cette étude est un support solide du conseil génétique du déficit en 21-hydroxylase notamment pour les nouvelles mutations identifiées chez les patients et sujets hétérozygotes.

Même si plusieurs techniques solides sont développées pour prédire la sévérité des nouvelles mutations, certains points fondamentaux sont à régler :

1- Etude fonctionnelle des autres mutations rares

Nous allons continuer les études fonctionnelles des mutations rares identifiées chez nos patients en commençant par les mutations les plus urgentes.

2- Développement d'un logiciel informatique :

Un logiciel bioinformatique, ALAMUT, est utilisé depuis plusieurs mois. Il permet d'avoir un premier aperçu sur la sévérité des mutations. Il est basé sur la conservation des acides aminés entre les différentes espèces et l'écart physico-chimique entre les deux acides aminés. Un développement de ce logiciel en se basant sur les principes cités ci-dessus est prévu pour avoir une idée plus précise sur la sévérité des nouvelles mutations.

3- Etudes fonctionnelles avec co-expression de POR

Des études fonctionnelles dans les levures en exprimant le cytochrome POR avec les différents mutants sont prévues en complément des études *in silico* pour mieux déterminer le domaine de liaison à POR.

4- Déterminer le caractère pathogène des nouvelles lésions introniques

Des études *in vitro* des mutants introniques sont prévues en utilisant le vecteur minigène.

5- Etudes fonctionnelles et structurales des autres gènes étudiés dans le laboratoire

Les mêmes études fonctionnelles et structurales réalisées pour le gène CYP21 seront étendues pour les autres cytochromes P450 étudiés dans le laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

(2002). Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4048-53.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.

Amor, M., Parker, K. L., Globerman, H., New, M. I. and White, P. C. (1988). Mutation in the CYP21B gene (Ile-172----Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1600-4.

Auchus, R. J. and Miller, W. L. (1999). Molecular modeling of human P450c17 (17alpha-hydroxylase/17,20-lyase): insights into reaction mechanisms and effects of mutations. *Mol Endocrinol* **13**, 1169-82.

Bachega, T. A., Billerbeck, A. E., Madureira, G., Marcondes, J. A., Longui, C. A., Leite, M. V., Arnhold, I. J. and Mendonca, B. B. (1998). Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 4416-9.

Bairoch, A., Apweiler, R., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M. et al. (2005). The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* **33**, D154-9.

Balsamo, A., Cacciari, E., Baldazzi, L., Tartaglia, L., Cassio, A., Mantovani, V., Piazzi, S., Cicognani, A., Pirazzoli, P., Mainetti, B. et al. (2000). CYP21 analysis and phenotype/genotype relationship in the screened population of the Italian Emilia-Romagna region. *Clin Endocrinol (Oxf)* **53**, 117-25.

Baralle, D. and Baralle, M. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet* **42**, 737-48.

Barbaro, M., Baldazzi, L., Balsamo, A., Lajic, S., Robins, T., Barp, L., Pirazzoli, P., Cacciari, E., Cicognani, A. and Wedell, A. (2006). Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. *J Mol Med* **84**, 521-8.

Barbaro, M., Lajic, S., Baldazzi, L., Balsamo, A., Pirazzoli, P., Cicognani, A., Wedell, A. and Cacciari, E. (2004). Functional analysis of two recurrent amino acid substitutions in the CYP21 gene from Italian patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2402-7.

Bastiaens, P. I., Bonants, P. J., Muller, F. and Visser, A. J. (1989). Time-resolved fluorescence spectroscopy of NADPH-cytochrome P-450 reductase: demonstration of energy transfer between the two prosthetic groups. *Biochemistry* **28**, 8416-25.

Baumgartner-Parzer, S. M., Nowotny, P., Waldhausl, W. and Vierhapper, H. (2003). A rare duplicated 21-hydroxylase haplotype and a de novo mutation: a family analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 2794-6.

Baumgartner-Parzer, S. M., Schulze, E., Waldhausl, W., Pauschenwein, S., Rondot, S., Nowotny, P., Meyer, K., Frisch, H., Waldhauser, F. and Vierhapper, H. (2001). Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Austria: identification of a novel missense mutation. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 4771-5.

Berman, H. M., Bhat, T. N., Bourne, P. E., Feng, Z., Gilliland, G., Weissig, H. and Westbrook, J. (2000). The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nat Struct Biol* **7 Suppl**, 957-9.

Bernhardt, R., Kraft, R., Otto, A. and Ruckpaul, K. (1988). Electrostatic interactions between cytochrome P-450 LM2 and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biomed Biochim Acta* **47**, 581-92.

Bernhardt, R., Makower, A., Janig, G. R. and Ruckpaul, K. (1984). Selective chemical modification of a functionally linked lysine in cytochrome P-450 LM2. *Biochim Biophys Acta* **785**, 186-90.

Billerbeck, A. E., Bachega, T. A., Frazatto, E. T., Nishi, M. Y., Goldberg, A. C., Marin, M. L., Madureira, G., Monte, O., Arnhold, I. J. and Mendonca, B. B. (1999). A novel missense mutation, GLY424SER, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 2870-2.

Billerbeck, A. E., Mendonca, B. B., Pinto, E. M., Madureira, G., Arnhold, I. J. and Bachega, T. A. (2002). Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4314-7.

Black, S. D., Martin, S. T. and Smith, C. A. (1994). Membrane topology of liver microsomal cytochrome P450 2B4 determined via monoclonal antibodies directed to the halt-transfer signal. *Biochemistry* **33**, 6945-51.

Bleicken, C., Loidi, L., Dhir, V., Parajes, S., Quinteiro, C., Dominguez, F., Grotzinger, J., Sippell, W. G., Riepe, F. G., Arlt, W. et al. (2008). Functional characterization of three CYP21A2 sequence variants (p.A265V, p.W302S, p.D322G) employing a yeast co-expression system. *Hum Mutat*.

Boddupalli, S. S., Hasemann, C. A., Ravichandran, K. G., Lu, J. Y., Goldsmith, E. J., Deisenhofer, J. and Peterson, J. A. (1992). Crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of P450terp and the hemoprotein domain of P450BM-3, enzymes belonging to two distinct classes of the cytochrome P450 superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5567-71.

Bonants, P. J., Muller, F., Vervoort, J. and Edmondson, D. E. (1990). A 31P-nuclear-magnetic-resonance study of NADPH-cytochrome-P-450 reductase and of the Azotobacter flavodoxin/ferredoxin-NADP+ reductase complex. *Eur J Biochem* **190**, 531-7.

Bose, H. S., Whittal, R. M., Baldwin, M. A. and Miller, W. L. (1999). The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7250-5.

Braman, J., Papworth, C. and Greener, A. (1996). Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol* **57**, 31-44.

Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y. T., Vakser, I. A., Loew, G. and Waskell, L. (1998). Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* **273**, 17036-49.

Bristow, J., Gitelman, S. E., Tee, M. K., Staels, B. and Miller, W. L. (1993). Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene". *J Biol Chem* **268**, 12919-24.

Chabre, O., Portrat-Doyen, S., Chaffanjon, P., Vivier, J., Liakos, P., Labat-Moleur, F., Chambaz, E., Morel, Y. and Defaye, G. (2000). Bilateral laparoscopic adrenalectomy for congenital adrenal hyperplasia with severe hypertension, resulting from two novel mutations in splice donor sites of CYP11B1. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 4060-8.

Chen, S. and Zhou, D. (1992). Functional domains of aromatase cytochrome P450 inferred from comparative analyses of amino acid sequences and substantiated by site-directed mutagenesis experiments. *J Biol Chem* **267**, 22587-94.

Chetkowski, R. J., DeFazio, J., Shamonki, I., Judd, H. L. and Chang, R. J. (1984). The incidence of late-onset congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency among hirsute women. *J Clin Endocrinol Metab* **58**, 595-8.

Chiou, S. H., Hu, M. C. and Chung, B. C. (1990). A missense mutation at Ile172----Asn or Arg356----Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* **265**, 3549-52.

Chothia, C., Lesk, A. M., Levitt, M., Amit, A. G., Mariuzza, R. A., Phillips, S. E. and Poljak, R. J. (1986). The predicted structure of immunoglobulin D1.3 and its comparison with the crystal structure. *Science* **233**, 755-8.

Chrousos, G. P., Munabi, A., Cutler, G. B., Jr. and Loriaux, D. L. (1982). Late-onset 21-hydroxylase deficiency. *Ann Intern Med* **97**, 281.

Chung, B. C., Matteson, K. J. and Miller, W. L. (1986a). Structure of a bovine gene for P-450c21 (steroid 21-hydroxylase) defines a novel cytochrome P-450 gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4243-7.

Chung, B. C., Matteson, K. J., Voutilainen, R., Mohandas, T. K. and Miller, W. L. (1986b). Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8962-6.

Cojocaru, V., Winn, P. J. and Wade, R. C. (2007). The ins and outs of cytochrome P450s. *Biochim Biophys Acta* **1770**, 390-401.

Collier, S., Sinnott, P. J., Dyer, P. A., Price, D. A., Harris, R. and Strachan, T. (1989). Pulsed field gel electrophoresis identifies a high degree of variability in the number of tandem 21-hydroxylase and complement C4 gene repeats in 21-hydroxylase deficiency haplotypes. *EMBO J* **8**, 1393-402.

Concolino, P., Vendittelli, F., Mello, E., Carelli Alinovi, C., Minucci, A., Carrozza, C., Santini, S. A., Zuppi, C. and Capoluongo, E. (2009a). Two novel CYP21A2 missense mutations in Italian patients with 21-hydroxylase deficiency: Identification and functional characterisation. *IUBMB Life* **61**, 229-35.

Concolino, P., Vendittelli, F., Mello, E., Minucci, A., Carrozza, C., Rossodivita, A., Giardina, B., Zuppi, C. and Capoluongo, E. (2009b). Functional analysis of two rare CYP21A2 mutations detected in Italian patients with a mildest form of congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* **71**, 470-6.

Cosme, J. and Johnson, E. F. (2000). Engineering microsomal cytochrome P450 2C5 to be a soluble, monomeric enzyme. Mutations that alter aggregation, phospholipid dependence of catalysis, and membrane binding. *J Biol Chem* **275**, 2545-53.

Cupp-Vickery, J. R. and Poulos, T. L. (1995). Structure of cytochrome P450eryF involved in erythromycin biosynthesis. *Nat Struct Biol* **2**, 144-53.

Curnow, K. M., Mulatero, P., Emeric-Blanchouin, N., Aupetit-Faisant, B., Corvol, P. and Pascoe, L. (1997). The amino acid substitutions Ser288Gly and Val320Ala convert the cortisol producing enzyme, CYP11B1, into an aldosterone producing enzyme. *Nat Struct Biol* **4**, 32-5.

Curnow, K. M., Tusie-Luna, M. T., Pascoe, L., Natarajan, R., Gu, J. L., Nadler, J. L. and White, P. C. (1991). The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* **5**, 1513-22.

De Lemos-Chiarandini, C., Frey, A. B., Sabatini, D. D. and Kreibich, G. (1987). Determination of the membrane topology of the phenobarbital-inducible rat liver cytochrome P-450 isoenzyme PB-4 using site-specific antibodies. *J Cell Biol* **104**, 209-19.

DeFranco, D. B. (2002). Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol Endocrinol* **16**, 1449-55.

Degtyarenko, K. N. (1995). Structural domains of P450-containing monooxygenase systems. *Protein Eng* **8**, 737-47.

Deneux, C., Tardy, V., Dib, A., Mornet, E., Billaud, L., Charron, D., Morel, Y. and Kuttenn, F. (2001). Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 207-13.

Di Pasquale, G., Wasniewska, M., Caruso, M., Salzano, G., Coco, M., Lombardo, F. and De Luca, F. (2005). Salt wasting phenotype in a compound heterozygous girl with P482S mutation associated with anovel mutation of CYP21 gene (Q481P). *J Endocrinol Invest* **28**, 1038-9.

Dolzan, V., Solyom, J., Fekete, G., Kovacs, J., Rakosnikova, V., Votava, F., Lebl, J., Pribilincova, Z., Baumgartner-Parzer, S. M., Riedl, S. et al. (2005). Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* **153**, 99-106.

Domalik, L. J., Chaplin, D. D., Kirkman, M. S., Wu, R. C., Liu, W. W., Howard, T. A., Seldin, M. F. and Parker, K. L. (1991). Different isozymes of mouse 11 beta-hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* **5**, 1853-61.

Donohoue, P. A., van Dop, C., McLean, R. H., White, P. C., Jospe, N. and Migeon, C. J. (1986). Gene conversion in salt-losing congenital adrenal hyperplasia with absent complement C4B protein. *J Clin Endocrinol Metab* **62**, 995-1002.

Erdmann, B., Gerst, H., Bulow, H., Lenz, D., Bahr, V. and Bernhardt, R. (1995). Zone-specific localization of cytochrome P45011B1 in human adrenal tissue by PCR-derived riboprobes. *Histochem Cell Biol* **104**, 301-7.

Ezquieta, B., Cueva, E., Oyarzabal, M., Oliver, A., Varela, J. M. and Jariego, C. (2002a). Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population. *Clin Genet* **62**, 181-8.

Ezquieta, B., Cueva, E., Varela, J., Oliver, A., Fernandez, J. and Jariego, C. (2002b). Non-classical 21-hydroxylase deficiency in children: association of adrenocorticotropic hormone-stimulated 17-hydroxyprogesterone with the risk of compound heterozygosity with severe mutations. *Acta Paediatr* **91**, 892-8.

Ezquieta, B., Oyarzabal, M., Jariego, C. M., Varela, J. M. and Chueca, M. (1999). A novel frameshift mutation in the first exon of the 21-OH gene found in homozygosity in an apparently nonconsanguineous family. *Horm Res* **51**, 135-41.

Forest, M. G. (1985). Pitfalls in prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency by amniotic fluid steroid analysis? A six years experience in 102 pregnancies at risk. *Ann N Y Acad Sci* **458**, 130-47.

Forest, M. G., Morel, Y. and David, M. (1998). Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol Metab* **9**, 284-9.

Friaes, A., Rego, A. T., Aragues, J. M., Moura, L. F., Mirante, A., Mascarenhas, M. R., Kay, T. T., Lopes, L. A., Rodrigues, J. C., Guerra, S. et al. (2006). CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. *Mol Genet Metab* **88**, 58-65.

Furuya, H., Shimizu, T., Hirano, K., Hatano, M., Fujii-Kuriyama, Y., Raag, R. and Poulos, T. L. (1989). Site-directed mutageneses of rat liver cytochrome P-450d: catalytic activities toward benzphetamine and 7-ethoxycoumarin. *Biochemistry* **28**, 6848-57.

Garlepp, M. J., Wilton, A. N., Dawkins, R. L. and White, P. C. (1986). Rearrangement of 21-hydroxylase genes in disease-associated MHC supratypes. *Immunogenetics* **23**, 100-5.

Geller, D. H., Auchus, R. J. and Miller, W. L. (1999). P450c17 mutations R347H and R358Q selectively disrupt 17,20-lyase activity by disrupting interactions with P450 oxidoreductase and cytochrome b5. *Mol Endocrinol* **13**, 167-75.

Gomes, L. G., Huang, N., Agrawal, V., Mendonca, B. B., Bachega, T. A. and Miller, W. L. (2009). Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: effect on 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 89-95.

Gonzalez, F. J. (1988). The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* **40**, 243-88.

Gotoh, O. (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* **267**, 83-90.

Graham, S. E. and Peterson, J. A. (1999). How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch Biochem Biophys* **369**, 24-9.

Grischuk, Y., Rubtsov, P., Riepe, F. G., Grotzinger, J., Beljelarskaia, S., Prassolov, V., Kalintchenko, N., Semitcheva, T., Peterkova, V., Tiulpakov, A. et al. (2006). Four novel missense mutations in the CYP21A2 gene detected in Russian patients suffering from the classical form of congenital adrenal hyperplasia: identification, functional characterization, and structural analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 4976-80.

Guengerich, F. P. and Johnson, W. W. (1997). Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry* **36**, 14741-50.

Hamdane, D., Xia, C., Im, S. C., Zhang, H., Kim, J. J. and Waskell, L. (2009). Structure and function of an NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450. *J Biol Chem* **284**, 11374-84.

Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S. S., Peterson, J. A. and Deisenhofer, J. (1995). Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* **3**, 41-62.

Hasemann, C. A., Ravichandran, K. G., Peterson, J. A. and Deisenhofer, J. (1994). Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 A resolution. *J Mol Biol* **236**, 1169-85.

Helmberg, A., Tusie-Luna, M. T., Tabarelli, M., Kofler, R. and White, P. C. (1992). R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. *Mol Endocrinol* **6**, 1318-22.

Higashi, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (1991). Functional analysis of mutant P450(C21) genes in COS cell expression system. *Methods Enzymol* **206**, 166-73.

Higashi, Y., Tanae, A., Inoue, H., Hiromasa, T. and Fujii-Kuriyama, Y. (1988). Molecular genetic analysis of steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency. *Acta Paediatr Jpn* **30 Suppl**, 105-10.

Higashi, Y., Yoshioka, H., Yamane, M., Gotoh, O. and Fujii-Kuriyama, Y. (1986). Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2841-5.

Hildebrandt, A. and Estabrook, R. W. (1971). Evidence for the participation of cytochrome b 5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch Biochem Biophys* **143**, 66-79.

Hlavica, P., Schulze, J. and Lewis, D. F. (2003). Functional interaction of cytochrome P450 with its redox partners: a critical assessment and update of the topology of predicted contact regions. *J Inorg Biochem* **96**, 279-97.

Hsu, L. C., Hsu, N. C., Guzova, J. A., Guzov, V. M., Chang, S. F. and Chung, B. C. (1996). The common I172N mutation causes conformational change of cytochrome P450c21 revealed by systematic mutation, kinetic, and structural studies. *J Biol Chem* **271**, 3306-10.

Hsu, N. C., Guzov, V. M., Hsu, L. C. and Chung, B. C. (1999). Characterization of the consequence of a novel Glu-380 to Asp mutation by expression of functional P450c21 in Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta* **1430**, 95-102.

Iyanagi, T. and Mason, H. S. (1973). Some properties of hepatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase. *Biochemistry* **12**, 2297-308.

Jaaskelainen, J., Levo, A., Voutilainen, R. and Partanen, J. (1997). Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: good correlation in a well defined population. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 3293-7.

Janner, M., Pandey, A. V., Mullis, P. E. and Fluck, C. E. (2006). Clinical and biochemical description of a novel CYP21A2 gene mutation 962_963insA using a new 3D model for the P450c21 protein. *Eur J Endocrinol* **155**, 143-51.

Jeske, Y. W., McGown, I. N., Harris, M., Bowling, F. G., Choong, C. S., Cowley, D. M. and Cotterill, A. M. (2009). 21-hydroxylase genotyping in Australasian patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab* **22**, 127-41.

Johnson, E. F., Wester, M. R. and Stout, C. D. (2002). The structure of microsomal cytochrome P450 2C5: a steroid and drug metabolizing enzyme. *Endocr Res* **28**, 435-41.

Kaplan, W. and Littlejohn, T. G. (2001). Swiss-PDB Viewer (Deep View). *Brief Bioinform* **2**, 195-7.

Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Toda, K., Yokoyama, Y., Miyahara, K., Miura, S., Ohnishi, T., Ichikawa, Y., Nakao, K., Imura, H. et al. (1992). Role of steroid 11 beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1458-62.

Kemp, C. A., Marechal, J. D. and Sutcliffe, M. J. (2005). Progress in cytochrome P450 active site modeling. *Arch Biochem Biophys* **433**, 361-8.

Kharrat, M., Tardy, V., M'Rad, R., Maazoul, F., Jemaa, L. B., Refai, M., Morel, Y. and Chaabouni, H. (2004). Molecular genetic analysis of Tunisian patients with a classic form of 21-hydroxylase deficiency: identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 368-74.

Kirby-Keyser, L., Porter, C. C. and Donohoue, P. A. (1997). E380D: a novel point mutation of CYP21 in an HLA-homozygous patient with salt-losing congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* **9**, 181-2.

Kirton, S. B., Baxter, C. A. and Sutcliffe, M. J. (2002). Comparative modelling of cytochromes P450. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 385-406.

Kitamura, M., Buczko, E. and Dufau, M. L. (1991). Dissociation of hydroxylase and lyase activities by site-directed mutagenesis of the rat P45017 alpha. *Mol Endocrinol* **5**, 1373-80.

Kominami, S., Ochi, H., Kobayashi, Y. and Takemori, S. (1980). Studies on the steroid hydroxylation system in adrenal cortex microsomes. Purification and characterization of cytochrome P-450 specific for steroid C-21 hydroxylation. *J Biol Chem* **255**, 3386-94.

Koyama, S., Toyoura, T., Saisho, S., Shimozawa, K. and Yata, J. (2002). Genetic analysis of Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency: identification of a patient with a new mutation of a homozygous deletion of adenine at codon 246 and patients without demonstrable mutations within the structural gene for CYP21. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 2668-73.

Krone, N., Braun, A., Roscher, A. A., Knorr, D. and Schwarz, H. P. (2000). Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 1059-65.

Krone, N., Braun, A., Roscher, A. A. and Schwarz, H. P. (1999). A novel frameshift mutation (141delT) in exon 1 of the 21-hydroxylase gene (CYP21) in a patient with the salt wasting form of congenital adrenal hyperplasia. Mutation in brief no. 255. Online. *Hum Mutat* **14**, 90-1.

Krone, N., Riepe, F. G., Gotze, D., Korsch, E., Rister, M., Commentz, J., Partsch, C. J., Grotzinger, J., Peter, M. and Sippell, W. G. (2005a). Congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase deficiency: functional characterization of two novel point mutations and a three-base pair deletion in the CYP11B1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 3724-30.

Krone, N., Riepe, F. G., Grotzinger, J., Partsch, C. J., Bramswig, J. and Sippell, W. G. (2005b). The residue E351 is essential for the activity of human 21-hydroxylase: evidence from a naturally occurring novel point mutation compared with artificial mutants generated by single amino acid substitutions. *J Mol Med* **83**, 561-8.

Krone, N., Riepe, F. G., Grotzinger, J., Partsch, C. J. and Sippell, W. G. (2005c). Functional characterization of two novel point mutations in the CYP21 gene causing simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 445-54.

Krone, N., Roscher, A. A., Schwarz, H. P. and Braun, A. (1998). Comprehensive analytical strategy for mutation screening in 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem* **44**, 2075-82.

Kuttenn, F., Couillin, P., Girard, F., Billaud, L., Vincens, M., Boucekkine, C., Thalabard, J. C., Maudelonde, T., Spritzer, P., Mowszowicz, I. et al. (1985). Late-onset adrenal hyperplasia in hirsutism. *N Engl J Med* **313**, 224-31.

Lachance, Y., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., Dumont, M., de Launoit, Y., Guerin, S., Leblanc, G. and Labrie, F. (1990). Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J Biol Chem* **265**, 20469-75.

Lajic, S., Bui, T. H., Holst, M., Ritzen, M. and Wedell, A. (1997a). [Prenatal diagnosis and treatment of adrenogenital syndrome. Prevent virilization of female fetuses]. *Lakartidningen* **94**, 4781-6.

Lajic, S., Clauin, S., Robins, T., Vexiau, P., Blanche, H., Bellanne-Chantelot, C. and Wedell, A. (2002). Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 2824-9.

Lajic, S., Levo, A., Nikoshkov, A., Lundberg, Y., Partanen, J. and Wedell, A. (1997b). A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. *Hum Genet* **99**, 704-9.

Lajic, S., Nikoshkov, A., Holst, M. and Wedell, A. (1999). Effects of missense mutations and deletions on membrane anchoring and enzyme function of human steroid 21-hydroxylase (P450c21). *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 384-90.

Lajic, S. and Wedell, A. (1996). An intron 1 splice mutation and a nonsense mutation (W23X) in CYP21 causing severe congenital adrenal hyperplasia. *Hum Genet* **98**, 182-4.

Lau, I. F., Soardi, F. C., Lemos-Marini, S. H., Guerra Jr, G., Jr., Baptista, M. T. and De Mello, M. P. (2001). H28+C insertion in the CYP21 gene: a novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 5877-80.

Lee, H. H., Chao, H. T., Lee, Y. J., Shu, S. G., Chao, M. C., Kuo, J. M. and Chung, B. C. (1998). Identification of four novel mutations in the CYP21 gene in congenital adrenal hyperplasia in the Chinese. *Hum Genet* **103**, 304-10.

Lehnerer, M., Schulze, J., Achterhold, K., Lewis, D. F. and Hlavica, P. (2000). Identification of key residues in rabbit liver microsomal cytochrome P450 2B4: importance in interactions with NADPH-cytochrome P450 reductase. *J Biochem* **127**, 163-9.

Lepesheva, G. I., Podust, L. M., Bellamine, A. and Waterman, M. R. (2001). Folding requirements are different between sterol 14alpha-demethylase (CYP51) from Mycobacterium tuberculosis and human or fungal orthologs. *J Biol Chem* **276**, 28413-20.

Levo, A. and Partanen, J. (2001). Novel mutations in the human CYP21 gene. *Prenat Diagn* **21**, 885-9.

Lewis, D. F. and Lee-Robichaud, P. (1998). Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* **66**, 217-33.

Lifton, R. P., Dluhy, R. G., Powers, M., Rich, G. M., Gutkin, M., Fallo, F., Gill, J. R., Jr., Feld, L., Ganguly, A., Laidlaw, J. C. et al. (1992). Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat Genet* **2**, 66-74.

Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J. F., 3rd, Clark, B. J., Stocco, D. M., Saenger, P., Rogol, A. and Miller, W. L. (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* **267**, 1828-31.

Lindberg, R. L. and Negishi, M. (1989). Alteration of mouse cytochrome P450coh substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. *Nature* **339**, 632-4.

Lisitsa, A., Archakov, A., Lewi, P. and Janssen, P. (2003). Bioinformatic insight into the unity and diversity of cytochromes P450. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **25**, 733-45.

Lobato, M. N., Ordonez-Sanchez, M. L., Tusie-Luna, M. T. and Meseguer, A. (1999). Mutation analysis in patients with congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population: identification of putative novel steroid 21-hydroxylase deficiency alleles associated with the classic form of the disease. *Hum Hered* **49**, 169-75.

Loke, K. Y., Lee, Y. S., Lee, W. W. and Poh, L. K. (2001). Molecular analysis of CYP-21 mutations for congenital adrenal hyperplasia in Singapore. *Horm Res* **55**, 179-84.

Lorence, M. C., Murry, B. A., Trant, J. M. and Mason, J. I. (1990). Human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5----4isomerase from placenta: expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/isomerization of C21 and C19 steroids. *Endocrinology* **126**, 2493-8.

Lu, A. Y., Junk, K. W. and Coon, M. J. (1969). Resolution of the cytochrome P-450-containing omega-hydroxylation system of liver microsomes into three components. *J Biol Chem* **244**, 3714-21.

Luu The, V., Lachance, Y., Labrie, C., Leblanc, G., Thomas, J. L., Strickler, R. C. and Labrie, F. (1989). Full length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol* **3**, 1310-2.

Menassa, R., Tardy, V., Despert, F., Bouvattier-Morel, C., Brossier, J. P., Cartigny, M. and Morel, Y. (2008). p.H62L, a rare mutation of the CYP21 gene identified in two forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 1901-8.

Mestres, J. (2005). Structure conservation in cytochromes P450. *Proteins* **58**, 596-609.

Miller, M. A., Hazzard, J. T., Mauro, J. M., Edwards, S. L., Simons, P. C., Tollin, G. and Kraut, J. (1988). Site-directed mutagenesis of yeast cytochrome c peroxidase shows histidine 181 is not required for oxidation of ferrocytochrome c. *Biochemistry* **27**, 9081-8.

Miller, W. (2005a). The adrenal cortex and its disorders. In *Brook's Clinical Pediatric Endocrinology 5th Edition,CGD Brook*, pp. pp 291-348.

Miller, W. L. (2005b). Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* **146**, 2544-50.

Modi, S., Paine, M. J., Sutcliffe, M. J., Lian, L. Y., Primrose, W. U., Wolf, C. R. and Roberts, G. C. (1996). A model for human cytochrome P450 2D6 based on homology modeling and NMR studies of substrate binding. *Biochemistry* **35**, 4540-50.

Monier, S., Van Luc, P., Kreibich, G., Sabatini, D. D. and Adesnik, M. (1988). Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **107**, 457-70.

Morel, Y., Andre, J., Uring-Lambert, B., Hauptmann, G., Betuel, H., Tossi, M., Forest, M. G., David, M., Bertrand, J. and Miller, W. L. (1989). Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Invest* **83**, 527-36.

Morel, Y. and Miller, W. L. (1991). Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Adv Hum Genet* **20**, 1-68.

Morel, Y., Murena, M., Forest, M., Nicolino, M. and David, M. (1991). Frequecy of the 8 known deleterious point mutations of the CYP11B gene in more than 100 families with 21-hydroxylase deficiency. *73rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington, DC, June 19-22, abstract 1379*.

Morel, Y., Murena, M., Nicolino, M. and Forest, M. (1992). Molecular genetics of the congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency *Cellular and Molecular Biology of the adrenal cortex,Colloque Inserm* **222**, p.123-126.

Mornet, E., Couillin, P., Kutten, F., Raux, M. C., White, P. C., Cohen, D., Boue, A. and Dausset, J. (1986). Associations between restriction fragment length polymorphisms detected with a probe for human 21-hydroxylase (21-OH) and two clinical forms of 21-OH deficiency. *Hum Genet* **74**, 402-8.

Mornet, E., Crete, P., Kuttenn, F., Raux-Demay, M. C., Boue, J., White, P. C. and Boue, A. (1991). Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* **48**, 79-88.

Mornet, E., Dupont, J., Vitek, A. and White, P. C. (1989). Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *J Biol Chem* **264**, 20961-7.

Mornet, E. and Gibrat, J. F. (2000). A 3D model of human P450c21: study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. *Hum Genet* **106**, 330-9.

Nakahara, K., Tanimoto, T., Hatano, K., Usuda, K. and Shoun, H. (1993). Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. *J Biol Chem* **268**, 8350-5.

Nakajin, S. and Hall, P. F. (1981). Side-chain cleavage of C21 steroids to C19 steroids by testicular microsomal cytochrome P-450: 17alpha-hydroxy C21 steroids as obligatory intermediates. *J Steroid Biochem* **14**, 1249-52.

Narayanasami, R., Otvos, J. D., Kasper, C. B., Shen, A., Rajagopalan, J., McCabe, T. J., Okita, J. R., Hanahan, D. J. and Masters, B. S. (1992). 31P NMR spectroscopic studies on purified, native and cloned, expressed forms of NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry* **31**, 4210-8.

Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W. et al. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **6**, 1-11.

Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O. et al. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* **12**, 1-51.

Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W. et al. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.

Nikoshkov, A., Lajic, S., Holst, M., Wedell, A. and Luthman, H. (1997). Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 194-9.

Nikoshkov, A., Lajic, S., Vlamis-Gardikas, A., Tranebjaerg, L., Holst, M., Wedell, A. and Luthman, H. (1998). Naturally occurring mutants of human steroid 21-hydroxylase (P450c21) pinpoint residues important for enzyme activity and stability. *J Biol Chem* **273**, 6163-5.

Nisimoto, Y. (1986). Localization of cytochrome c-binding domain on NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem* **261**, 14232-9.

Nunez, B. S., Lobato, M. N., White, P. C. and Meseguer, A. (1999). Functional analysis of four CYP21 mutations from spanish patients with congenital adrenal hyperplasia. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 635-7.

Ogishima, T., Suzuki, H., Hata, J., Mitani, F. and Ishimura, Y. (1992). Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-45011 beta in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. *Endocrinology* **130**, 2971-7.

Ohlsson, G., Muller, J. and Schwartz, M. (1999). Genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency: DGGE-based mutation scanning of CYP21. *Hum Mutat* **13**, 385-9.

Omura, T. and Sato, R. (1964). The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* **239**, 2370-8.

Oprian, D. D. and Coon, M. J. (1982). Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P-450 reductase during reduction by NADPH. *J Biol Chem* **257**, 8935-44.

Ordonez-Sanchez, M. L., Ramirez-Jimenez, S., Lopez-Gutierrez, A. U., Riba, L., Gamboa-Cardiel, S., Cerrillo-Hinojosa, M., Altamirano-Bustamante, N., Calzada-Leon, R., Robles-Valdes, C., Mendoza-Morfin, F. et al. (1998). Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Hum Genet* **102**, 170-7.

Otyepka, M., Skopalik, J., Anzenbacherova, E. and Anzenbacher, P. (2007). What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date? *Biochim Biophys Acta* **1770**, 376-89.

Owerbach, D., Crawford, Y. M. and Draznin, M. B. (1990). Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. *Mol Endocrinol* **4**, 125-31.

Pandey, A. V., Kempna, P., Hofer, G., Mullis, P. E. and Fluck, C. E. (2007). Modulation of human CYP19A1 activity by mutant NADPH P450 oxidoreductase. *Mol Endocrinol* **21**, 2579-95.

Pang, S. Y., Wallace, M. A., Hofman, L., Thuline, H. C., Dorche, C., Lyon, I. C., Dobbins, R. H., Kling, S., Fujieda, K. and Suwa, S. (1988). Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* **81**, 866-74.

Paperna, T., Gershoni-Baruch, R., Badarneh, K., Kasinetz, L. and Hochberg, Z. (2005). Mutations in CYP11B1 and congenital adrenal hyperplasia in Moroccan Jews. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 5463-5.

Penning, T. M. (1997). Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev* **18**, 281-305.

Peterson, J. A. and Graham, S. E. (1998). A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450. *Structure* **6**, 1079-85.

Pinto, G., Tardy, V., Trivin, C., Thalassinos, C., Lortat-Jacob, S., Nihoul-Fekete, C., Morel, Y. and Brauner, R. (2003). Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 2624-33.

Podust, L. M., Yermalitskaya, L. V., Lepesheva, G. I., Podust, V. N., Dalmasso, E. A. and Waterman, M. R. (2004). Estriol bound and ligand-free structures of sterol 14alpha-demethylase. *Structure* **12**, 1937-45.

Pollack, M. S., Levine, L. S., O'Neill, G. J., Pang, S., Lorenzen, F., Kohn, B., Rondanini, G. F., Chiumello, G., New, M. I. and Dupont, B. (1981). HLA linkage and B14, DR1, BfS haplotype association with the genes for late onset and cryptic 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* **33**, 540-50.

Portrat, S., Mulatero, P., Curnow, K. M., Chaussain, J. L., Morel, Y. and Pascoe, L. (2001). Deletion hybrid genes, due to unequal crossing over between CYP11B1 (11beta-hydroxylase) and CYP11B2(aldosterone synthase) cause steroid 11beta-hydroxylase deficiency and congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 3197-201.

Poulos, T. L., Finzel, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C. and Kraut, J. (1985). The 2.6-A crystal structure of Pseudomonas putida cytochrome P-450. *J Biol Chem* **260**, 16122-30.

Poulos, T. L., Finzel, B. C. and Howard, A. J. (1987). High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J Mol Biol* **195**, 687-700.

Poulos, T. L. and Raag, R. (1992). Cytochrome P450cam: crystallography, oxygen activation, and electron transfer. *FASEB J* **6**, 674-9.

Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasermann, C. A., Peterson, J. A. and Deisenhofer, J. (1993). Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* **261**, 731-6.

Reincke, M., Beuschlein, F., Menig, G., Hofmockel, G., Arlt, W., Lehmann, R., Karl, M. and Allolio, B. (1998). Localization and expression of adrenocorticotropic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex. *J Endocrinol* **156**, 415-23.

Rheaume, E., Lachance, Y., Zhao, H. F., Breton, N., Dumont, M., de Launoit, Y., Trudel, C., Luu-The, V., Simard, J. and Labrie, F. (1991). Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol* **5**, 1147-57.

Ridderstrom, M., Masimirembwa, C., Trump-Kallmeyer, S., Ahlefelt, M., Otter, C. and Andersson, T. B. (2000). Arginines 97 and 108 in CYP2C9 are important determinants of the catalytic function. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 983-7.

Riepe, F. G., Hiort, O., Grotzinger, J., Sippell, W. G., Krone, N. and Holterhus, P. M. (2008). Functional and structural consequences of a novel point mutation in the CYP21A2 gene causing congenital adrenal hyperplasia: potential relevance of helix C for P450 oxidoreductase-21-hydroxylase interaction. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 2891-5.

Robins, T., Barbaro, M., Lajic, S. and Wedell, A. (2005). Not all amino acid substitutions of the common cluster E6 mutation in CYP21 cause congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 2148-53.

Robins, T., Bellanne-Chantelot, C., Barbaro, M., Cabrol, S., Wedell, A. and Lajic, S. (2007). Characterization of novel missense mutations in CYP21 causing congenital adrenal hyperplasia. *J Mol Med* **85**, 247-55.

Robins, T., Carlsson, J., Sunnerhagen, M., Wedell, A. and Persson, B. (2006). Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Mol Endocrinol* **20**, 2946-64.

Rodrigues, N. R., Dunham, I., Yu, C. Y., Carroll, M. C., Porter, R. R. and Campbell, R. D. (1987). Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J* **6**, 1653-61.

Rowland, P., Blaney, F. E., Smyth, M. G., Jones, J. J., Leydon, V. R., Oxbrow, A. K., Lewis, C. J., Tennant, M. G., Modi, S., Eggleston, D. S. et al. (2006). Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem* **281**, 7614-22.

Sakaguchi, M., Mihara, K. and Sato, R. (1984). Signal recognition particle is required for co-translational insertion of cytochrome P-450 into microsomal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3361-4.

Sali, A. and Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**, 779-815.

Sasano, H., White, P. C., New, M. I. and Sasano, N. (1988). Immunohistochemistry of cytochrome P-450 21-hydroxylase: microscopic examination of the enzyme in the bovine adrenal cortex and kidney. *Endocrinology* **122**, 291-5.

Schoch, G. A., Yano, J. K., Wester, M. R., Griffin, K. J., Stout, C. D. and Johnson, E. F. (2004). Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site. *J Biol Chem* **279**, 9497-503.

Scott, E. E., He, Y. A., Wester, M. R., White, M. A., Chin, C. C., Halpert, J. R., Johnson, E. F. and Stout, C. D. (2003). An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13196-201.

Scott, E. E., White, M. A., He, Y. A., Johnson, E. F., Stout, C. D. and Halpert, J. R. (2004). Structure of mammalian cytochrome P450 2B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 1.9-A resolution: insight into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding. *J Biol Chem* **279**, 27294-301.

Shen, A. L. and Kasper, C. B. (1995). Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c. *J Biol Chem* **270**, 27475-80.

Shen, S. and Strobel, H. W. (1993). Role of lysine and arginine residues of cytochrome P450 in the interaction between cytochrome P4502B1 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys* **304**, 257-65.

Shimizu, T., Tateishi, T., Hatano, M. and Fujii-Kuriyama, Y. (1991). Probing the role of lysines and arginines in the catalytic function of cytochrome P450d by site-directed mutagenesis. Interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* **266**, 3372-5.

Soardi, F. C., Barbaro, M., Lau, I. F., Lemos-Marini, S. H., Baptista, M. T., Guerra-Junior, G., Wedell, A., Lajic, S. and de Mello, M. P. (2008). Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 2416-20.

Song, W. C., Baertschi, S. W., Boeglin, W. E., Harris, T. M. and Brash, A. R. (1993). Formation of epoxyalcohols by a purified allene oxide synthase. Implications for the mechanism of allene oxide synthesis. *J Biol Chem* **268**, 6293-8.

Speiser, P. W., Dupont, B., Rubinstein, P., Piazza, A., Kastelan, A. and New, M. I. (1985). High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* **37**, 650-67.

Speiser, P. W., Dupont, J., Zhu, D., Serrat, J., Buegeleisen, M., Tusie-Luna, M. T., Lesser, M., New, M. I. and White, P. C. (1992). Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* **90**, 584-95.

Speiser, P. W. and New, M. I. (1987). Genotype and hormonal phenotype in nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **64**, 86-91.

Speiser, P. W., New, M. I. and White, P. C. (1988). Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14,DR1. *N Engl J Med* **319**, 19-23.

Stikkelbroeck, N. M., Hoefsloot, L. H., de Wijs, I. J., Otten, B. J., Hermus, A. R. and Sistermans, E. A. (2003). CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 3852-9.

Sugiyama, T., Nisimoto, Y., Mason, H. S. and Loehr, T. M. (1985). Flavins of NADPH-cytochrome P-450 reductase: evidence for structural alteration of flavins in their one-electron-reduced semiquinone states from resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry* **24**, 3012-9.

Szczesna-Skorupa, E., Browne, N., Mead, D. and Kemper, B. (1988). Positive charges at the NH2 terminus convert the membrane-anchor signal peptide of cytochrome P-450 to a secretory signal peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 738-42.

Szklarz, G. D., Graham, S. E. and Paulsen, M. D. (2000). Molecular modeling of mammalian cytochromes P450: application to study enzyme function. *Vitam Horm* **58**, 53-87.

Szklarz, G. D. and Halpert, J. R. (1997). Use of homology modeling in conjunction with site-directed mutagenesis for analysis of structure-function relationships of mammalian cytochromes P450. *Life Sci* **61**, 2507-20.

Szklarz, G. D., He, Y. Q., Kedzie, K. M., Halpert, J. R. and Burnett, V. L. (1996). Elucidation of amino acid residues critical for unique activities of rabbit cytochrome P450 2B5 using hybrid enzymes and reciprocal site-directed mutagenesis with rabbit cytochrome P450 2B4. *Arch Biochem Biophys* **327**, 308-18.

Tamburini, P. P. and Gibson, G. G. (1983). Thermodynamic studies of the protein-protein interactions between cytochrome P-450 and cytochrome b5. Evidence for a central role of the cytochrome P-450 spin state in the coupling of substrate and cytochrome b5 binding to the terminal hemoprotein. *J Biol Chem* **258**, 13444-52.

Tardy, V., Forest, M. G., A, D. R. and Morel, Y. (2005). Detection of heterozygotes for 21-hydroxylase deficiency : validation of 21-deoxycortisol after ACTH test by sequencing of the entire gene. 7th LWPES/ESPE (Lawson Wilkins Paediatric Endocrine Society/ European Society for Paediatric Endocrinology) Joint Meeting. Lyon, France, 21-24 Septembre 2005. *Horm Research* **64 (supp1) : 41(Com. orale)**.

Tardy, V., Pinto, E., Forest, M. and Morel, Y. (2001). Phenotypic variation of P30Lmutation could be explained by its association with a new 5' gene conversion of CYP21 gene to CYP21P. *Pediatr Res* **49:11A**.

Thomas, J. L., Myers, R. P. and Strickler, R. C. (1989). Human placental 3 beta-hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5----4-ene-isomerase: purification from mitochondria and kinetic profiles, biophysical characterization of the purified mitochondrial and microsomal enzymes. *J Steroid Biochem* **33**, 209-17.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-80.

Tusie-Luna, M. T., Speiser, P. W., Dumic, M., New, M. I. and White, P. C. (1991). A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol* **5**, 685-92.

Tusie-Luna, M. T., Traktman, P. and White, P. C. (1990). Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem* **265**, 20916-22.

Usui, T., Nishisho, K., Kaji, M., Ikuno, N., Yorifuji, T., Yasuda, T., Kuzuya, H. and Shimatsu, A. (2004). Three novel mutations in Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res* **61**, 126-32.

V . Ullrich, H. H. R., in: R.A. Sheldon (Ed.),. (1994). Metalloporphyrins in Catalytic Oxydations. In *Dekker, New York,* (ed., pp. 157-186.

Voutilainen, R., Tapanainen, J., Chung, B. C., Matteson, K. J. and Miller, W. L. (1986). Hormonal regulation of P450scc (20,22-desmolase) and P450c17 (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* **63**, 202-7.

Wedell, A. (1998). Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Acta Paediatr* **87**, 159-64.

Wedell, A. and Luthman, H. (1993a). Steroid 21-hydroxylase (P450c21): a new allele and spread of mutations through the pseudogene. *Hum Genet* **91**, 236-40.

Wedell, A. and Luthman, H. (1993b). Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum Mol Genet* **2**, 499-504.

Wedell, A., Ritzen, E. M., Haglund-Stengler, B. and Luthman, H. (1992). Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7232-6.

Wedell, A., Thilen, A., Ritzen, E. M., Stengler, B. and Luthman, H. (1994). Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab* **78**, 1145-52.

Werkmeister, J. W., New, M. I., Dupont, B. and White, P. C. (1986). Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet* **39**, 461-9.

Wester, M. R., Johnson, E. F., Marques-Soares, C., Dansette, P. M., Mansuy, D. and Stout, C. D. (2003a). Structure of a substrate complex of mammalian cytochrome P450 2C5 at 2.3 A resolution: evidence for multiple substrate binding modes. *Biochemistry* **42**, 6370-9.

Wester, M. R., Johnson, E. F., Marques-Soares, C., Dijols, S., Dansette, P. M., Mansuy, D. and Stout, C. D. (2003b). Structure of mammalian cytochrome P450 2C5 complexed with diclofenac at 2.1 A resolution: evidence for an induced fit model of substrate binding. *Biochemistry* **42**, 9335-45.

White, P. C., Dupont, J., New, M. I., Leiberman, E., Hochberg, Z. and Rosler, A. (1991). A mutation in CYP11B1 (Arg-448----His) associated with steroid 11 beta-hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin. *J Clin Invest* **87**, 1664-7.

White, P. C., New, M. I. and Dupont, B. (1986). Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5111-5.

White, P. C. and Speiser, P. W. (2000). Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* **21**, 245-91.

Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F. and McRee, D. E. (2000a). Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell* **5**, 121-31.

Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F. and McRee, D. E. (2000b). Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *J Inorg Biochem* **81**, 183-90.

Williams, P. A., Cosme, J., Vinkovic, D. M., Ward, A., Angove, H. C., Day, P. J., Vonrhein, C., Tickle, I. J. and Jhoti, H. (2004). Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* **305**, 683-6.

Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Matak Vinkovic, D. and Jhoti, H. (2003). Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* **424**, 464-8.

Wilson, R. C., Mercado, A. B., Cheng, K. C. and New, M. I. (1995). Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 2322-9.

Witchel, S. F., Smith, R. and Suda-Hartman, M. (1999). Identification of CYP21 mutations, one novel, by single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis. Mutations in brief no. 218. Online. *Hum Mutat* **13**, 172.

Wu, D. A. and Chung, B. C. (1991). Mutations of P450c21 (steroid 21-hydroxylase) at Cys428, Val281, and Ser268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. *J Clin Invest* **88**, 519-23.

Yamano, S., Aoyama, T., McBride, O. W., Hardwick, J. P., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. (1989). Human NADPH-P450 oxidoreductase: complementary DNA cloning, sequence and vaccinia virus-mediated expression and localization of the CYPOR gene to chromosome 7. *Mol Pharmacol* **36**, 83-8.

Yano, J. K., Wester, M. R., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D. and Johnson, E. F. (2004). The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-A resolution. *J Biol Chem* **279**, 38091-4.

Yasukochi, Y., Peterson, J. A. and Masters, B. S. (1979). NADPH-cytochrome c (P-450) reductase. Spectrophotometric and stopped flow kinetic studies on the formation of reduced flavoprotein intermediates. *J Biol Chem* **254**, 7097-104.

Zeng, X., Witchel, S. F., Dobrowolski, S. F., Moulder, P. V., Jarvik, J. W. and Telmer, C. A. (2004). Detection and assignment of CYP21 mutations using peptide mass signature genotyping. *Mol Genet Metab* **82**, 38-47.

Zhang, P., Nason, T. F., Han, X. G. and Hall, P. F. (1992). Gene for 17 alpha-hydroxylase/C (17-20) lyase P-450: complete nucleotide sequence of the porcine gene and 5' upstream sequence of the rat gene. *Biochim Biophys Acta* **1131**, 345-8.

RESUME en français

Le déficit en 21-hydroxylase est la cause la plus fréquente des hyperplasies congénitales des surrénales. Un grand nombre de nouvelles mutations a été trouvé dans le laboratoire qui centralise la plus grande cohorte de familles au niveau international et l'évaluation de leur sévérité était primordiale pour optimiser la prise en charge des patients (thérapeutique, conseil génétique). Grâce à l'analyse approfondie du phénotype des patients et au développement d'études fonctionnelles (*in vitro, in silico*), nous avons pu évaluer le retentissement de la plupart des 85 nouvelles mutations ; nous avons choisi comme témoins des mutations fréquentes de sévérité connue et nous avons comparé nos résultats avec ceux de la littérature. L'analyse plus approfondie d'une quinzaine de mutations rares a confirmé l'existence de bonnes corrélations phénotype-génotype comme ceci est décrit dans cette pathologie. Par ailleurs, les études structurales que nous avons développées ont permis d'améliorer les connaissances sur les relations structure-fonction des cytochromes P450 en général.

TITRE en anglais

Functional and structural studies of *CYP21A2* gene mutants in congenital adrenal hyperplasia

RESUME en anglais

Steroid 21-hydroxylase deficiency is the most common enzymatic defect causing congenital adrenal hyperplasia. A large number of new mutations has been detected in the laboratory, which centralizes the biggest cohort of families in the world, and evaluation of their severity was essential to optimize the care of the patients (treatment, genetic counselling). Thanks to detailed analysis of the patients phenotype and to the development of functional studies (*in vitro, in silico*), we were able to evaluate the severity of most of the 85 novel mutations; we decided to use as controls frequent known mutations and to compare our results with those of literature. The more detailed analysis of about fifteen rare mutations confirmed the existence of good correlations phenotype-genotype as this is described in this pathology. Moreover, the structural studies we developed led to improve the knowledge on structure-function relationship of the P450 cytochromes family.

DISCIPLINE

Biologie Moléculaire et Cellulaire-Physiologie

MOTS-CLES

Hyperplasie Congénitale des Surrénales, *CYP21A2*, études fonctionnelles, CYP21, études structurales, corrélations phénotype-génotype.

KEYWORDS

Congenital adrenal hyperplasia, *CYP21A2*, functional studies, CYP21, structural studies, phenotype-genotype correlations

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares
Centre de Biologie et Pathologie Est
59 Boulevard Pinel
69677 BRON CEDEX