

2 n/11.3292.9

Université de Montréal

**Caractérisation de l'activité phénotypique des Isoenzymes du
cytochrome P450 chez des patients avec maladie du foie**

Par

Mélanie Assoubeng-Mba

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès.sciences (M.sc)
En pharmacologie

Décembre 2004

© Mélanie Assoubeng-Mba, 2004



W

4

U58

2005

v. 123

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce Mémoire intitulé :

Caractérisation de l'activité phénotypique des Isoenzymes du cytochrome P450
chez des patients avec maladie du foie

Présenté par :
Mélanie Assoubeng-Mba

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Vincent Pichette, président-rapporteur
Jean-Pierre Villeneuve, directeur de recherche
Patrick du Souich, membre du jury

RÉSUMÉ

Les maladies chroniques du foie entraînent à long terme une détérioration de la fonction hépatique, avec comme conséquence une diminution du métabolisme des médicaments. Un grand nombre de ces médicaments sont métabolisés par une famille d'isoenzymes, appelée cytochrome P450 (CYP450). Pour évaluer la réserve fonctionnelle hépatique, on mesure souvent la vitesse d'élimination de médicaments "modèles". Le but de cette étude était de caractériser l'activité de différentes isoenzymes du cytochrome P450, en particulier celle du CYP2C19 chez des patients avec cirrhose du foie, puis d'évaluer l'impact de la sévérité de la maladie sur cette activité. Après avoir validé chez 17 sujets sains un cocktail de phénotypage des CYP 1A2, 2C19, 2E1 et 3A4, nous l'avons administré à 105 patients avec cirrhose du foie pour caractériser l'activité de ces isoenzymes. La concentration sérique des substances administrées a été quantifiée par HPLC et le ratio de concentration du métabolite principal sur celui de la substance-mère a été utilisé comme index de l'activité. Nous avons constaté que l'activité du CYP2C19 était considérablement réduite, alors que celle du CYP2E1 était inchangée en présence de cirrhose. L'activité des CYP1A2 et 3A4 était diminuée de façon inversement proportionnelle à la sévérité de la maladie. En conclusion, le CYP2C19 est très sensible à la présence d'une maladie du foie contrairement au CYP2E1 qui n'est pas affecté par celle-ci. La sévérité de la maladie influence l'activité des CYP1A2 et 3A4.

Mots-clés : cirrhose du foie, cytochrome P450, métabolisme des médicament

ABSTRACT

Chronic liver diseases lead over a long period of time to an impaired hepatic function, with as a consequence a decrease of drug metabolism. The majority of drug metabolism is mediated by a family of isoenzymes, named cytochrome P450 (CYP450). To assess the functional hepatic reserve, the rate elimination of probe drugs metabolized by CYP450 is often measured. The aim of this study was to characterize the activity of different CYP450 isoenzymes, particularly CYP2C19 activity in patients with liver cirrhosis and to assess the effect of the severity of the liver disease on CYP2C19 activity. After the validation of a CYP 1A2, 2C19, 2E1 and 3A4 phenotyping cocktail in 17 healthy subjects, the cocktail was administered to 105 patients with liver cirrhosis to characterize CYP450 isoenzymes activity. The drug concentrations were analyzed by HPLC and the ratio of the main metabolite to the parent drug was used as index of the activity. We observed that the CYP2C19 activity was considerably reduced, while the CYP2E1 activity was unchanged in patients with cirrhosis. The decrease in CYP1A2 and CYP3A4 activities were inversely proportional to the severity of the disease. In conclusion, the CYP2C19 is very sensitive to the presence of chronic liver disease unlike the CYP2E1 which is not affected by it. CYP1A2 and CYP3A4 activities decrease in parallel with the severity of cirrhosis.

Keys words: liver cirrhosis, cytochrome P450, drugs metabolism

Table des matières

Listes des tableaux	VIII
Listes des figures.....	IX
Listes des abréviations	XIII

PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Introduction	2
--------------------	---

CHAPITRE 1 : LE FOIE

1.1 Anatomie	4
1.2 Fonctions du foie	5
1.2.1 Fonction métabolique	5
1.2.1.1 Homéostasie.....	5
1.2.1.2 Synthèse, défense et filtre	6
1.2.1.3 Métabolisme et excrétion.....	6
1.2.2 Fonction biliaire	7
1.3 Tests hépatiques	8
1.3.1 La bilirubine	8
1.3.2 Les aminotransférases	9
1.3.3 La phosphatase alcaline	10
1.3.4 La gamma glutamyl transpeptidase	10
1.3.5 Protides sériques et immunoglobulines	11
1.3.6 Prothrombine	11

CHAPITRE 2 : LES MALADIES DU FOIE

2.1 Histoire naturelle et évolution	14
2.2 Manifestations cliniques de la maladie	16
2.3 Évaluation de la sévérité de la maladie	18

CHAPITRE 3 : LE CYTOCHROME P450

3.1 Définition et bref historique	21
3.2 Les familles et les sous familles du CYP450	22
3.2.1 La famille CYP1	23
3.2.2 La famille CYP2	24
3.2.3 La famille CYP3	25
3.3 Mécanisme d'action	26
3.4 Régulation de l'activité et de l'expression du CYP450	28
3.4.1 Induction enzymatique	28
3.4.2 Inhibition enzymatique	30
3.5 Effets des maladies du foie sur le métabolisme des médicaments	31

CHAPITRE 4 : TESTS QUANTITATIFS DE LA FONCTION HÉPATIQUE

4.1 Prédiction du métabolisme des médicaments	37
4.2 Revue des médicaments modèles	39
4.3 Avantages et importances des tests	40
4.4 Test d'exhalaison de l'aminopyrine et de l'érythromycine	42
4.5 Les autres tests	43

DEUXIÈME PARTIE: SUJETS ET MÉTHODES

Objectifs de l'étude	45
SUJETS ET MÉTHODES	
Sujets sains	45
Patients avec maladie du foie	46
Consentement éclairé	47
Protocole expérimental	47
Études chez les sujets sains	47
Études chez les sujets avec maladie du foie	49
Dosage des échantillons	49

Essai HPLC de l'oméprazole	50
Essai HPLC de la chlorzoxazone	51
Essai HPLC de la caféine	53
Dosage du ¹⁴ CO ₂ provenant de l'érythromycine	54
Définitions des variables	54
Analyses statistiques	55
Sujets sains.....	55
Patients	56

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS

Sujets sains	58
Sujets avec maladie du foie	64
Oméprazole	67
Caféine, chlorzoxazone et érythromycine	71
Corrélations de l'oméprazole	77
Témoins.....	77
Patients avec cirrhose et post-greffe	79
Corrélations des autres sondes.....	82
Témoins.....	83
Patients avec cirrhose.....	84
Patients post-greffe	86

QUATRIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSION

Discussion	89
A. Études chez les sujets sains	89
B. Études chez les patients avec maladie du foie	93
Conclusion	101
Références	103

Liste des tableaux

Tableau I	: Critères de la classification de Child-Turcotte	19
Tableau II	: Critères de la classification de Pugh	19
Tableau III	: Définition des rapports métaboliques utilisés	55
Tableau IV	: Données biochimiques et hématologiques des sujets sains	58
Tableau V	: Comparaison des rapports métaboliques obtenus	63
Tableau VI	: Description et données de laboratoire des patients cirrhotiques..	64
Tableau VII	: Description et données de laboratoire des patients post-greffe...	65

Liste des figures

Figure 1 : Rapport métabolique de l'oméprazole au temps d'obtention des concentrations sériques maximales	61
Figure 2 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone au temps 4 heures	61
Figure 3 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone au temps 4 heures.....	62
Figure 4 : Test respiratoire à l'érythromycine : pourcentage de la dose administrée exprimée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ en 1 heure	62
Figure 5 : Ratios métaboliques de l'oméprazole chez les différents groupes de sujets étudiés	68
Figure 6 : Ratios métaboliques de l'oméprazole en fonction du score Pugh chez les patients cirrhotiques	68
Figure 7 : Ratios métaboliques de l'oméprazole en fonction de l'étiologie de la maladie chez les patients cirrhotiques	69
Figure 8 : Ratios métaboliques de l'oméprazole en fonction du score Pugh chez les patients post-greffe du foie	70
Figure 9 : Ratios métaboliques de la caféine en fonction du score Pugh chez les patients cirrhotiques (n=71)	71
Figure 10 : Ratios métaboliques de la chlorzoxazone en fonction du score Pugh chez les patients cirrhotiques (n=71)	72

Figure 11 : Test respiratoire à l'érythromycine en fonction du score Pugh chez les patients cirrhotiques (n=71)	73
Figure 12 : Ratios métaboliques de la caféine chez les différents groupes de sujets étudiés	74
Figure 13 : Ratios métaboliques de la chlorzoxazone chez les différents groupes de sujets étudiés	75
Figure 14 : Test respiratoire à l'érythromycine chez les différents groupes de sujets étudiés	76
Figure 15 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP1A2 chez les témoins	77
Figure 16 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et CYP3A4 chez les témoins	78
Figure 17 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP2E1 chez les témoins	78
Figure 18 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP2E1 chez les patients cirrhotiques	79
Figure 19 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et CYP3A4 chez les patients cirrhotiques	80
Figure 20 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP1A2 chez les patients cirrhotiques	80

Figure 21 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP1A2 chez les patients post-greffe du foie 81

Figure 22 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP2E1 chez les patients post-greffe du foie 81

Figure 23 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP3A4 chez les patients post-greffe du foie 82

Figure 24 : Courbe de corrélation des activités du CYP1A2 et du CYP2E1 chez les témoins 83

Figure 25 : Courbe de corrélation des activités du CYP2E1 et du CYP3A4 chez les témoins 83

Figure 26 : Courbe de corrélation des activités du CYP1A2 et du CYP3A4 chez les témoins 84

Figure 27 : Courbe de corrélation des activités du CYP2E1 et du CYP3A4 chez les patients cirrhotiques 84

Figure 28 : Courbe de corrélation des activités du CYP1A2 et du CYP3A4 chez les patients cirrhotiques 85

Figure 29 : Courbe de corrélation entre les activités du CYP1A2 et du CYP2E1 chez les patients cirrhotiques 85

Figure 30 : Courbe de corrélation entre les activités du CYP1A2 et du CYP3A4 chez les patients post-greffe du foie 86

Figure 31 : Courbe de corrélation des activités du CYP1A2 et du CYP2E1 chez les patients post-greffe du foie 86

Figure 32 : Courbe de corrélation des activités du CYP2E1 et du CYP3A4 chez les patients post-greffe du foie 87

Liste des abréviations

ABT:	Aminopyrine Breath Test
ALT:	Alanine Aminotransférase
AP :	Phosphatase alcaline
AST :	Aspartate Aminotransférase
BSP:	Bromo-Sulfone-phtaléine
CHC:	Carcinome Hépatocellulaire
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
CXZ:	Chlorzoxazone
CYP 450:	Cytochrome P 450
EBT:	Erythromycin Breath Test
GEC:	Capacité d'élimination du galactose
GGT:	Gamma Glutamyl Transpeptidase
HCL:	Acide chlorhydrique
ICG:	Vert d'Indocyanine
Ig :	Immunoglobuline
I.V. :	Voie intraveineuse
MEG-X :	Monoethylglycine-xylidide
O ₂ :	Dioxygène
OH-CXZ :	Hydroxychlorzoxazone
OH-OPZ :	Hydroxyoméprazole
OPZ :	Oméprazole

P.O : Voie orale

POST-TOF : Post Transplantation orthotopique du foie

RNI : Ratio Normalisé International

VHC : Virus de l'hépatite C

VS : Versus

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent au Dr Jean-Pierre Villeneuve, qui a été pour moi un directeur de recherche mais aussi un second père. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et d'avoir cru en moi. Merci également pour votre aide inestimable, vos conseils avisés, votre patience, vos encouragements, votre enseignement et votre compréhension en particulier durant ma grossesse. J'ai beaucoup appris grâce à vous et apprécié la relation de patron mais aussi de père à fille que nous avons eu. Merci infiniment!

Merci à Louise Trudel, Technicienne de laboratoire pour son aide et ses conseils avisés tout au long de la réalisation de ce projet. Je vais m'ennuyer de nos conversations et de l'ambiance au sein du laboratoire.

Merci à Pierre Bannon, biochimiste clinique au CHUM pour son aide dans la mise au point de l'essai HPLC de l'oméprazole.

Merci à Suzanne Marcotte et Jean-Guillaume Gagnon pour leur aide dans la réalisation conjointe de l'étude chez les sujets sains.

Merci aux membres du jury d'avoir pris le temps d'évaluer ce mémoire.

Merci à Manon Bourcier, pour son aide dans le support informatique.

Merci à toute ma famille, en particulier ma mère, mes frères et sœurs pour leur soutien moral, leurs encouragements et surtout leur chaleur familiale qui m'ont été d'une grande aide.

Merci à mon amie Rosy qui est une grande-sœur et à sa fille Latifah pour leur soutien moral et les moments de fou rire passés ensemble.

Merci infiniment à mon mari Sosthène pour son amour, son soutien inconditionnel, ses prodigieux conseils, ses encouragements et son aide inestimable. Merci également de m'avoir donné la plus belle chose qui me soit jamais arrivé : ma fille et mon plus cher trésor, Romy Ivana.

Je dédie ce mémoire à toute ma famille, en particulier à mon défunt père, ma mère, ma grand-mère, mon mari mais spécialement à ma fille chérie et adorée, Romy Ivana qui est ma plus belle réalisation.

PREMIÈRE PARTIE

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Introduction

Les maladies chroniques du foie sont caractérisées par une évolution lente et progressive sur une période de plusieurs années. Lorsque les premiers signes de la maladie apparaissent, elle est déjà à un stade très avancé avec de sérieuses complications.

La qualité de vie ainsi que l'état de santé général des personnes atteintes en sont très affectés. On estime à un Canadien sur 12, le nombre de personnes souffrant de maladies du foie et à 25 000 le nombre de personnes qui en décèdent en Amérique du Nord chaque année. De plus, la cirrhose du foie est la 7^{ème} cause de décès pour maladie (Fondation canadienne du foie, 2003).

Les principaux traitements visent à arrêter ou retarder la progression de la maladie. Une greffe est aussi envisageable. Pour évaluer la progression de la maladie et estimer le pronostic, il est important d'évaluer la réserve fonctionnelle hépatique.

La mesure de la vitesse d'élimination de médicaments " modèles " a été proposée comme test quantitatif de la fonction hépatique. Ces médicaments sont métabolisés par le cytochrome P450 (CYP450) qui constitue une superfamille d'isoenzymes.

Ce mémoire a pour but de caractériser l'activité de différentes isoenzymes du foie, en particulier celle du CYP2C19 chez les patients avec une cirrhose du foie, puis d'évaluer l'impact de la sévérité de la maladie sur cette activité.

Pour bien cerner le sujet, nous allons faire la revue de la littérature dans les chapitres suivants.

CHAPITRE 1

LE FOIE

1. LE FOIE

1.1 Anatomie

Le foie est un organe volumineux de forme ovoïde, situé dans l'abdomen et pesant entre 1.5 et 2 kg. Il se compose de deux lobes principaux (droit et gauche), séparés par le ligament falciforme. L'unité structurale du foie est le lobule hépatique, un groupement de cellules hépatiques (hépatocytes) centré sur une veinule. Chaque lobule est un prisme polyédrique dont chaque angle est occupé par un espace porte. Un espace porte est constitué d'un ou deux canaux biliaires puis d'une branche de l'artère hépatique et d'une de la veine porte (Benhamou et Erlinger, 1986). Les hépatocytes sont agencés en lames de cellules qui délimitent des sinusoides à l'intérieur desquels se fait la circulation sanguine. Le foie est très richement vascularisé et reçoit le sang artériel par l'artère hépatique et le sang veineux provenant du tube digestif par la veine porte. L'acinus hépatique ou unité fonctionnelle du foie est formé d'un espace triangulaire centré sur l'espace porte et ayant pour base une ligne imaginaire qui réunit deux veines centrolobulaires. Des cellules endothéliales bordent les sinusoides et l'espace entre ces cellules et les hépatocytes se nomme espace de Disse. On trouve dans cet espace, quelques rares cellules (cellules de Ito) ainsi que quelques fibres de collagène. Il est à noter que les hépatocytes représentent 60% des cellules du foie et occupent à peu près 80% du volume du foie avec un diamètre moyen de 25 μm . (Arias et coll., 1982). Aussi, leur cytoplasme contient différents organites dont des mitochondries, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et des lysosomes.

Le système biliaire quant à lui, commence au niveau du canalicule biliaire qui est situé entre les faces accolées de deux ou trois hépatocytes adjacents. La bile se déverse à

partir des canalicules biliaires pour entrer dans les ductules (conduits biliaires), les canaux biliaires hépatiques plus gros et les canaux hépatiques droit et gauche qui fusionnent pour former le canal hépatique commun (Zakim et Boyer, 1990). Ce dernier rejoint le canal cystique pour former le canal cholédoque. L'ensemble formé par les canaux hépatique commun et cholédoque se nomme la voie biliaire principale.

1.2 Fonctions du foie

Le foie a des fonctions multiples, diverses et vitales. Il assure en effet avec la vésicule biliaire un bon nombre de fonctions essentielles à l'organisme. Ses fonctions peuvent globalement se classer en deux grandes catégories : une fonction biliaire ou exocrine et une fonction métabolique ou endocrine.

1.2.1 Fonction métabolique

Les organelles des hépatocytes et les membranes des cellules ont des activités biochimiques spécifiques qui régulent des fonctions spécifiques.

1.2.1.1 Homéostasie

Le foie joue tout d'abord un rôle clé dans le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Il assure en effet l'homéostasie de tous ces nutriments ainsi que celle des hormones et des vitamines, en particulier les vitamines A, D, E et K.

Selon l'état nutritionnel, il capte et entrepose le glucose sous forme de glycogène (glycogénèse) ou il dégrade ce dernier en glucose (glycogénolyse) et au besoin, forme du glucose à partir des acides aminés (glyconéogenèse) (Site aol).

Le foie capte également les acides gras, les estérifie en triglycérides, puis lie ceux-ci avec le cholestérol, les phospholipides et les apoprotéines pour former des lipoprotéines qui sont mises en réserve dans les adipocytes. En période de jeûne, il procède plutôt à la β -oxydation des acides gras. Il maintient ainsi l'équilibre de presque tous les nutriments en tenant compte des besoins de l'organisme.

1.2.1.2 Synthèse, défense et filtre

Le foie a également un rôle de synthèse. Il synthétise le cholestérol, les sels biliaires et la majeure partie des protéines y compris la plupart des globulines, les facteurs de coagulation et l'albumine. Aussi, il intervient dans le stockage des vitamines et du cholestérol (Site aol).

Une autre de ses fonctions est un rôle de défense immunitaire puis de filtre.

Le foie produit des substances protectrices et anti-toxiques. Grâce à sa position stratégique (entre les intestins et le reste du corps), il agit comme filtre en prévenant que des substances toxiques (poisons, xénobiotiques...) ou des bactéries passent des intestins dans le sang. Toutefois, il faut aussi ajouter qu'il aide le système immunitaire à combattre les cellules et les substances nocives qui menacent l'organisme. Les cellules de Kupffer du foie sont par ailleurs des macrophages spécialisés (Reichen, 1999).

1.2.1.3 Métabolisme et excrétion

Le foie est non seulement le siège du catabolisme mais il a aussi un rôle de détoxification. En effet, c'est lui qui capture, transforme et rend inoffensifs les substances nocives auxquelles nous pouvons être exposés en mangeant, buvant ou en respirant.

Aussi, il excrète les médicaments, les poisons (pesticides, insecticides, métaux lourds...), les acides biliaires, le cholestérol et les déchets provenant du métabolisme comme la bilirubine (le produit de dégradation de l'hémoglobine). Afin d'excréter les déchets azotés provenant du métabolisme des acides aminés et potentiellement toxiques, il synthétise l'urée (Zakim et Boyer, 1990).

Enfin, le foie est muni d'un système enzymatique très riche qui lui permet d'assurer le métabolisme ou la biotransformation de nombreuses substances (y inclus l'alcool) et de polluants xénobiotiques. Comme le métabolisme des médicaments et des substances endogènes est l'un de ses rôles majeurs, nous discuterons de cet aspect en détail ultérieurement.

1.2.2 Fonction biliaire

Le foie synthétise la bile puis l'excrète dans la vésicule biliaire où elle est concentrée et stockée. La vésicule biliaire est un organe verdâtre de 7.5 cm de long, situé sous le foie et qui sert à entreposer la bile, puis la déverser dans le duodénum via le canal cystique.

La bile est une solution composée d'eau, d'électrolytes et de solutés organiques. Les principaux composés organiques sont le cholestérol, les acides biliaires, les phospholipides et la bilirubine conjuguée (Benhamou et Erlinger, 1986). La formation de la bile se fait selon des mécanismes distincts dont nous ne discuterons pas. Toutefois, la bile constitue une voie d'épuration et est nécessaire à la digestion et à l'absorption efficaces des lipides alimentaires et des vitamines. En effet, au niveau du duodénum, la bile agit comme détergent biologique et rend ainsi les lipides alimentaires

hydrosolubles : ce qui facilite leur absorption. Aussi, les déchets lipidiques, les métabolites toxiques, le cholestérol sont excrétés par la bile (Site aol).

Finalement, les acides biliaires sécrétés dans la bile sont pour la plupart réabsorbés au niveau de l'intestin où ils retournent au foie via la veine porte, pour être à nouveau captés et sécrétés dans la bile. Une partie des acides biliaires est d'abord transformée sous l'action des bactéries au niveau du côlon, avant d'être réabsorbée. Ils suivent donc un cycle appelé entérohépatique (de l'intestin au foie).

1.3 Tests hépatiques

Certains tests de laboratoire sont utiles pour le diagnostic des maladies du foie. Ceux-ci se classent en deux catégories : les examens non spécifiques et les examens spécifiques. Alors que les examens non spécifiques permettent de déterminer si un patient présente une maladie du foie, les examens spécifiques permettent de préciser l'étiologie de la pathologie. Nous discuterons uniquement des principaux examens non spécifiques qui sont considérés comme indispensables.

1.3.1 La Bilirubine

La concentration sérique normale de la bilirubine est de 5 à 17 $\mu\text{mol/L}$ et est presque entièrement sous la forme non conjuguée. Elle reflète la balance entre les vitesses de production et d'excrétion hépatobiliaire. Lorsque la bilirubine sérique augmente et dépasse 25 $\mu\text{mol/L}$, il y a apparition d'un ictère qui devient franc au-dessus de 50 $\mu\text{mol/L}$.

L'hyperbilirubinémie non conjuguée peut être due soit à une augmentation de la production de la bilirubine (due à une hémolyse), soit à une diminution de la conjugaison de la bilirubine causée par une anomalie génétique (Benhamou et Erlinger, 1986). Les ictères secondaires à la bilirubine conjuguée ou l'hyperbilirubinémie conjuguée résultent d'un reflux de la bilirubine déjà conjuguée dans le milieu intérieur. Cette régurgitation peut être due à une obstruction des voies biliaires, un dysfonctionnement des hépatocytes, ou un défaut dans l'excrétion hépatique.

1.3.2 Les Aminotransférases

L'ALT et l'AST sont deux enzymes retrouvées en abondance dans le foie et le muscle. Toutefois, l'ALT a une concentration hépatique plus élevée que celle de l'AST et est plus spécifique au foie que cette dernière qui est retrouvée dans d'autres organes. L'augmentation de leur concentration dans le sérum est observée dans plusieurs formes de maladies hépatiques, mais surtout celles associées avec une nécrose significative des hépatocytes (Pratt et Kaplan, 1999).

Le rapport AST/ALT peut être utile dans le diagnostic différentiel. Il y a une augmentation plus ou moins prononcée des aminotransférases avec un rapport ALT/AST supérieur à 1, en cas de nécrose hépatique d'origine médicamenteuse, virale, toxique ou ischémique. En revanche, ce rapport est inférieur à 1 en cas de nécrose hépatique d'origine alcoolique. L'augmentation des aminotransférases est en général supérieure à dix fois la normale lorsqu'un patient présente une nécrose hépatique aiguë mais est plus modérée en cas de nécrose hépatique chronique ou de cholestase.

1.3.3 La Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (AP) est présente dans une variété de tissus (foie, intestin, rein, placenta). Toutefois, sa production tend à augmenter dans les tissus sous stimulation métabolique comme le foie et la moelle osseuse. En présence d'une maladie du foie, l'élévation de l'AP est due à une augmentation de sa synthèse et sa relâche dans le sérum. Les concentrations de phosphatase alcaline sérique augmentent de deux à quatre fois la limite supérieure de la normale en cas de cholestase. Cette augmentation est due à une production massive de l'enzyme par l'hépatocyte. Des élévations marquées de l'enzyme sont observées surtout en présence de l'obstruction biliaire.

1.3.4 La Gammaglutamyl transpeptidase (GGT)

La GGT est une enzyme produite principalement par les hépatocytes. Tout comme la phosphatase alcaline, elle se retrouve dans beaucoup de tissus extrahépatiques.

Le taux de GGT sérique augmente considérablement (entre 10 et 20 fois la limite supérieure de la normale) en cas de cholestase, et modérément (5 à 10 fois la normale) en cas de nécrose hépatique (Benhamou et Erlinger, 1986). Cette augmentation est accompagnée en général d'une élévation des phosphatases alcalines sériques et des aminotransférases pour la cholestase et la nécrose respectivement. La GGT est aussi une enzyme inductible par l'alcool et les drogues et augmente fortement en cas d'alcoolisme chronique et ce, qu'il y ait ou non une lésion hépatique.

1.3.5 Protides sériques et immunoglobulines

La concentration d'albumine sérique est normalement de 45g/L et représente 55% des protides sériques. Les hépatocytes synthétisent et secrètent environ 10 g d'albumine chaque jour. Toutefois, en présence d'une maladie progressive du foie, la capacité synthétique de l'albumine diminue et sa concentration sérique tombe. Dans les cas d'insuffisance hépatocellulaire chronique, le taux d'albumine est diminué, mais il ne faut pas oublier que de nombreuses autres causes peuvent justifier l'hypoalbuminémie.

Les gammaglobulines ont un taux de 13.5 g/L et représentent 18% des protides sériques. Ce taux augmente entre 15 et 25 g/L dans la plupart des hépatopathies chroniques. En revanche, l'immunoglobuline A est augmentée en cas de cirrhose alcoolique, ce qui cause ainsi une fusion des 2 globulines β et γ (Benhamou et Erlinger, 1986).

Les immunoglobulines G, A et M ont normalement des taux respectifs de 7 à 15 g/L, 2 à 5 g/L et 0.8 à 2 g/L. Ces taux sont augmentés généralement pour les trois classes en cas d'hépatopathie. L'IgA est fortement augmenté en cas de cirrhose alcoolique, tandis que l'IgG augmente de façon prédominante en cas d'hépatite auto-immune et l'IgM augmente de façon prédominante en cas de cirrhose biliaire primitive.

1.3.6 Prothrombine

Les facteurs de coagulation (fibrinogène, prothrombine, facteur V, VII, IX et X) sont synthétisés par le foie, qui joue un rôle important dans l'hémostase. A l'exception du facteur IX, le temps de Quick ou temps de prothrombine (appelé aussi INR) mesure l'activité de ces facteurs, impliqués dans le processus intrinsèque de coagulation et permet d'apprécier leur taux (Pratt et Kaplan, 1999).

En présence d'insuffisance hépatocellulaire ou de cholestase, la synthèse de ces facteurs diminue, entraînant ainsi un allongement du temps de Quick. Toutefois, dans le cas de la cholestase, cela est dû à un défaut d'absorption de la vitamine K qui est essentielle à la formation des facteurs II, VII et X (actifs biologiquement). L'administration de vitamine K peut donc corriger cet allongement du temps de Quick et le réduire d'au moins 30% en 24 heures. L'étude des facteurs de coagulation est utile pour évaluer le degré d'insuffisance hépatocellulaire.

CHAPITRE 2

LES MALADIES DU FOIE

2. MALADIES DU FOIE

2.1 Histoire naturelle et évolution

Les maladies chroniques du foie, que ce soit la cirrhose due à une hépatite C chronique (cirrhose C), la cirrhose alcoolique, auto-immune, cryptogénique, biliaire primitive ou la cholangite sclérosante ont une évolution similaire. Dans les lignes qui suivent, nous allons décrire l'histoire naturelle et l'évolution de l'hépatite C à titre d'exemple, mais il faut noter que le schéma d'évolution est applicable à toutes les autres maladies chroniques du foie.

L'hépatite C est une maladie du foie causée par un virus, appelé virus de l'hépatite C ou VHC. Le virus de l'hépatite C est un virus à ARN appartenant à la famille des flavivirus et qui se réplique de façon extrêmement vigoureuse. Ses cibles naturelles sont les hépatocytes et possiblement les lymphocytes B (Lauer et Walker, 2001). L'infection par le VHC est répandue à travers le monde entier et touche un nombre de personnes considérable. Son mode de transmission se fait surtout par l'utilisation de drogues en injection et par transfusion sanguine.

L'infection par le VHC entraîne à des degrés variables, lorsqu'elle devient chronique, une activité inflammatoire (inflammation lymphoplasmocytaire et nécrose des hépatocytes) et une fibrose : on est alors en présence d'une hépatite chronique. Des études récentes estiment que 50% ou plus des hépatocytes renferment le virus (Lauer et Walker, 2001).

On parle de fibrose hépatique lorsqu'il y a accumulation d'un excès de fibres de collagènes (protéines) entre les hépatocytes et que cet excès étouffe les hépatocytes et durcit considérablement le foie à un point tel qu'il devient rigide et difficilement

perméable à la circulation sanguine. La fibrose est progressive et passe successivement de légère à modérée puis à sévère. Dans la phase initiale de l'hépatite chronique, l'architecture hépatique est conservée. Cependant, après un certain temps la fibrose désorganise l'architecture lobulaire et on assiste à la formation de nodules de régénération par le foie (Benhamou et Erlinger, 1986). Les cellules hépatiques essaient en effet de fonctionner mais n'y arrivent pas bien parce que leur architecture n'est pas conforme à leur fonction : il y a alors apparition d'une cirrhose. Plusieurs études menées sur l'évolution à long terme d'une hépatite C post-transfusionnelle ont montré une progression vers la cirrhose chez environ 20% des sujets (Tremolada et coll., 1992; Di Bisceglie et coll., 1991; Realdi et coll., 1982).

La cirrhose est une maladie chronique et irréversible qui se définit de façon anatomique et se caractérise donc par une fibrose diffuse, la formation de nodules de régénération et une modification de l'architecture vasculaire. Une fois que la cirrhose est installée, elle évolue en deux phases : une phase asymptomatique où elle est dite compensée et une phase symptomatique où elle est dite décompensée. La période asymptomatique peut durer plusieurs années (Benhamou et Erlinger, 1986). À ce stade, la maladie est latente et comme il n'y a parfois aucun symptôme, elle peut être découverte de façon fortuite lors d'un examen clinique.

Ce n'est que lorsque la maladie est à un stade très avancé, que les premières manifestations cliniques apparaissent. À ce moment, la cirrhose est décompensée et des complications surviennent. Il est important de mentionner que la cirrhose peut également conduire à un carcinome hépatocellulaire (CHC). En effet, Kiyosawa et coll. (1990) ont montré une association causale entre le virus de l'hépatite C et le CHC. Cela

a également été confirmé par d'autres études qui ont montré qu'il y avait chez certains patients avec une hépatite C et ayant eu une cirrhose, une progression de la maladie en cancer (Dienstag, 1997).

Finalement, bien que variable, la période de temps sur laquelle les différents stades de la maladie évoluent est de plusieurs années. En effet, certains facteurs peuvent accélérer la progression de la maladie mais toujours est-il que cette période peut être de 20 ans ou moins ou encore de 30 ans ou plus après l'infection (Lauer et Walker, 2001).

En résumé, l'histoire naturelle et l'évolution des maladies chroniques du foie suivent la séquence suivante : foie normal → affection chronique → fibrose progressive → cirrhose compensée → cirrhose décompensée → CHC.

2.2 Manifestations cliniques de la maladie

Les manifestations cliniques des maladies chroniques du foie sont en fait les complications de la cirrhose. Elles se présentent à la phase décompensée de la cirrhose, lorsque la maladie a atteint un stade très avancé. Les complications de la cirrhose sont essentiellement l'hypertension portale et l'insuffisance hépatique (Schiff et Schiff, 1993). Toutefois, des complications plus rares comme des infections, des carences hormonales et le cancer du foie peuvent se produire.

L'insuffisance hépatique est l'ensemble des manifestations qui surviennent suite à une diminution de la fonction hépatique. Autrement dit, c'est la perte pour le foie, de sa capacité à assurer ses fonctions (synthèse, épuration, sécrétion biliaire) (Benhamou et Erlinger, 1986). Pour la fonction d'épuration, le foie a de la difficulté à éliminer les

médicaments. Cela peut entraîner une hypersensibilité aux médicaments et une encéphalopathie si ces médicaments ont un effet sur le système nerveux central.

L'encéphalopathie se définit comme une auto-intoxication par des substances neurotoxiques produites par l'intestin et normalement éliminées par le foie. Ces toxines passent dans la circulation générale, s'accumulent dans le sang et affectent ainsi le cerveau (Benhamou et Erlinger, 1986). L'encéphalopathie engendre des troubles de la conscience, du comportement, un coma et évolue en trois phases de gravité croissante.

Pour la fonction de synthèse, le foie ne synthétise plus les protéines comme l'albumine et les facteurs de coagulation. Il s'ensuit alors des troubles de la coagulation du sang qui peuvent favoriser des hémorragies.

Pour la fonction de sécrétion biliaire, le foie ne secrète plus la bile : il y a alors apparition de cholestase. La conséquence est un reflux dans le milieu intérieur des substances normalement éliminées dans la bile : ce qui est le cas de la bilirubine conjuguée. Ce reflux de bilirubine conjuguée entraîne un ictère qui se caractérise par une jaunisse (Schiff et Schiff, 1993).

En présence d'insuffisance hépatique, les patients souffrent de faiblesse généralisée, fatigue, perte d'appétit et leur santé se détériore.

L'hypertension portale est une élévation de la différence entre la pression dans la veine porte et celle de la veine cave inférieure, au-delà de 5 mm de mercure (Hg).

En effet, quand le foie est bloqué par la fibrose, le sang veineux provenant du tube digestif demeure bloqué en amont : ce qui fait monter la pression (Liberherr, 2001).

L'augmentation de pression entraîne la formation de nouveaux vaisseaux autour du foie, dont les varices oesophagiennes et gastriques. Il peut alors se produire une rupture de

varices à cause de l'hypertension portale et de la minceur des parois vasculaires. Cette rupture de varices peut conduire à une hémorragie digestive grave, généralement abondante et souvent mortelle (Benhamou et Erlinger, 1986). Finalement, l'hypertension portale peut mener à la formation d'ascite.

L'ascite est définie comme une accumulation de liquide dans la cavité péritonéale. Elle se produit seulement lorsqu'il y a une rétention de sodium et une hypertension portale. Aussi, elle est parfois associée avec un œdème des membres inférieurs.

2.3 Évaluation de la sévérité de la maladie

Les manifestations cliniques de la cirrhose dépendent surtout du degré de l'insuffisance hépatique, de la présence de l'hypertension portale et de la capacité des hépatocytes intacts ou survivants à compenser les pertes subies (Heathcote, site gastroresource).

Plus la maladie évolue, plus elle devient sévère. Les tests de laboratoire de routine ne sont pas spécifiques et permettent juste de déterminer l'existence ou non d'une maladie du foie. Or, pour estimer le pronostic et administrer aux patients un traitement adéquat, il est important de déterminer la sévérité de leur maladie.

Pour évaluer la sévérité de la maladie, on tient compte de plusieurs critères susceptibles de refléter l'évolution de la maladie.

Ainsi, Child et Turcotte d'une part et Pugh d'autre part ont proposé une classification à partir de 5 critères permettant d'évaluer la sévérité de la maladie (Conn, 1981; Pugh et coll., 1973). Le principe de cette classification est de définir trois stades de gravité croissante de la maladie à l'aide d'un score. A cet effet, des points sont attribués aux

cinq critères selon la gravité de la maladie et leur total donne un score appelé score de Child ou score de Pugh.

C'est le score de Pugh qui permet d'évaluer la sévérité de la maladie. La classification de Child-Turcotte ainsi que celle de Pugh sont résumés dans les tableaux I et II .

Dans les deux classifications, le score va de 5 à 15. Un score de 5-6 indique une cirrhose compensée, un score de 7-9 une insuffisance hépatique modérée, et un score de 10-15 une insuffisance hépatique sévère.

Tableau I : Critères de la classification de Child-Turcotte

	1 point	2 points	3 points
Encéphalopathie	absente	Minime	Coma
Ascite	absente	Contrôlée	Non contrôlée
Bilirubine ($\mu\text{mol/L}$)	< 35	35-50	> 50
Albumine (g/L)	> 35	30-35	< 30
Etat nutritionnel	excellent	Bon	Mauvais

Tableau II : Critères de la classification de Pugh

	1 point	2 points	3 points
Encéphalopathie	absente	Confusion	Coma
Ascite	absente	Discrète	Modérée
Bilirubine ($\mu\text{mol/L}$)	< 35	35-50	> 50
Albumine (g/L)	> 35	28-35	< 28
Prothrombine (RNI)	< 1.7	1.7-2.3	< 2.3

CHAPITRE 3

LE CYTOCHROME P450

3. LE CYTOCHROME P450

3.1 Définition et bref historique

Le cytochrome P450 (CYP450) constitue une superfamille d'hémaprotéines possédant un anneau protoporphyrine IX avec au centre un atome de fer capable de lier l'oxygène et pouvant passer réversiblement de la forme oxydée (Fe^{3+}) à la forme réduite (Fe^{2+}). Aussi, le système d'oxydation du CYP450 est constitué de deux hémaprotéines (le cytochrome b5 et le cytochrome CYP450) et de deux flavoprotéines (la NADPH cytochrome P450 réductase et la NADH cytochrome b5 réductase) appartenant à deux chaînes respiratoires et servant de transporteurs d'électrons (Zakim et Boyer, 1990).

Le principe de fonctionnement de ce système est le transfert d'électrons du NADPH aux deux flavines de la flavoprotéine NADPH cytochrome P450 réductase, puis de la flavoprotéine réduite au CYP450 qui les transfère au substrat qui sera oxydé.

Les CYP450 sont principalement localisés à la surface de la membrane du réticulum endoplasmique du foie (microsomes). Toutefois, certains CYP450 sont également exprimés dans le rein, la peau, les poumons, l'intestin et le système nerveux central. On retrouve les CYP450 chez les animaux, les plantes, les mammifères et les bactéries (Gascon et Dayer, 1991).

Le CYP450 a été découvert dans le laboratoire de Brodie au début des années 1950. En 1955, Brodie et Axelrod ont mis en évidence un système enzymatique microsomial et dépendant du NADPH, capable de transformer un grand nombre de substrats. En 1962, Omura et Sato ont identifié dans des microsomes de foie de lapin un pigment hémaprotéique (P) qui avait un pic d'absorption à 450 nm lorsque réduit et complexé

avec du monoxyde de carbone (Omura et Sato, 1964). Cette découverte est à l'origine du nom cytochrome P450.

Finalement, plusieurs isoformes (protéines) ont été identifiées dans ce système d'oxygénases à fonction mixte en 1968. Il faut toutefois noter qu'un seul et même gène ancestral a donné naissance à la superfamille du CYP450 qui compte de multiples isoenzymes.

Les différentes isoenzymes (protéines) du CYP450 sont classées en familles et sous-familles selon leur pourcentage d'homologie dans la séquence de leurs acides aminés. Leur nomenclature tient compte de ces critères (Gascon et Dayer, 1991). Par exemple, pour l'isoenzyme CYP2C19, 2 désigne la famille, C la sous-famille, 19 l'isoenzyme et CYP le cytochrome P450. Notons que ces isoenzymes ont des spécificités de substrats différentes mais qui se chevauchent.

Actuellement, plus de 270 familles de gènes CYP450 dont 18 chez les mammifères ont été identifiées. Chez l'humain, il existe 57 gènes CYP450 et 33 pseudogènes classés en 18 familles et 42 sous-familles (Nebert et Russell, 2002).

3.2 Les familles et les sous-familles du CYP450

Les différentes isoenzymes de la superfamille du CYP450 métabolisent les xénobiotiques et les substrats endogènes et participent aussi à la synthèse de lipides endogènes.

Il existe chez l'humain 18 familles de cytochromes P450. Toutefois, le métabolisme des médicaments est médié presque exclusivement par les familles CYP 1, 2 et 3 (Ishizaki et

Horai, 1999; Perri et Coll.,1994). De plus, les six isoenzymes CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 et 3A4 métabolisent la majorité des médicaments (Ishizaki et Horai, 1999).

Nous nous contenterons de décrire dans ce chapitre les isoenzymes du CYP450 que nous avons étudiées dans ce mémoire.

3.2.1 La famille CYP1

Cette famille comprend deux sous- familles : le CYP1A et le CYP1B. L'expression du gène de la famille CYP1 est induite par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (3-méthylcholanthrène, dioxine) (Nebert et Russell., 2002).

La sous-famille CYP1A.

Cette sous- famille comprend deux protéines : les CYP1A1 et 1A2.

Le CYP1A2 est exprimé de façon constitutive et presque exclusive dans le foie alors que le CYP1A1 est détectable seulement après un traitement avec des inducteurs et est exprimé dans différents tissus (Nebert et Russell., 2002). Contrairement au CYP1A1 qui métabolise les hydrocarbures aromatiques polycycliques, le CYP1A2 métabolise préférentiellement les arylamines et les N-hétérocycliques. Ce dernier métabolise environ dix à vingt médicaments différents dont la caféine, la théophylline et la phénacétine. Il a été démontré que la cigarette et la nourriture cuite au charbon de bois sont des inducteurs du CYP 1A2 (Perri et coll., 1994).

Enfin, les enzymes de la famille du CYP1 semblent jouer un rôle important dans la détoxification et l'activation des carcinogènes environnementaux.

3.2.2 La famille CYP2

Cette famille comprend 13 sous-familles et est la plus grande famille du CYP450 chez les mammifères. Les membres de chaque sous-famille ont 67 % d'homologie de séquences (Perri et coll., 1994).

La sous-famille CYP2C

Le CYP2C représente 20 % de tous les cytochromes hépatiques. Un grand nombre des médicaments fréquemment prescrits ainsi que certains stéroïdes et l'acide arachidonique sont métabolisés par les enzymes CYP2C8, 2C9, 2C18 et 2C19 (Nebert et Russell., 2002). Il faut toutefois noter qu'un polymorphisme génétique existe au niveau du métabolisme pour certaines isoformes de cette sous-famille dont les CYP2C8, 2C9 et 2C19. Le CYP2C19 métabolise les inhibiteurs des pompes à protons dont l'oméprazole ainsi que des substances comme la S-méphénytoïne, l'imipramine, le propranolol, et le diazépam.

Parmi les inducteurs de la sous-famille CYP2C, on peut citer la rifampicine et le phénobarbital. En revanche, le tranlycypromine et la cimétidine sont des inhibiteurs des enzymes CYP2C19 et 2C9 respectivement . Il est à noter que l'oméprazole est en même temps un substrat et un inhibiteur du CYP2C19 (Ishizaki et Horai, 1999).

La sous famille CYP2E

Chez l'humain, cette sous famille comprend à ce jour une seule isoenzyme : le CYP2E1. Cette enzyme a été purifiée, reconstituée et exprimée à partir du foie humain où elle se retrouve en majorité. Elle représente 7 % des cytochromes hépatiques totaux. Aussi,

elle métabolise diverses substances comme l'éthanol, la chlorzoxazone, l'acétaminophène et les nitrosamines (Ishizaki et Horai, 1999; Gascon et Dayer, 1991). Il semble que l'induction de cette enzyme joue un rôle dans le développement des cancers (cancer de la sphère ORL et du foie) (Gascon et Dayer, 1991; Villeneuve et Pichette, 2004). Parmi les inducteurs du CYP2E1, on peut citer l'éthanol et le pyrazole tandis que le disulfiram et le diméthyl sulfoxyde sont des inhibiteurs (Ishizaki et Horai, 1999). Des évidences indiquent une variabilité interindividuelle significative médiée par cette enzyme (Gascon et Dayer, 1991).

3.2.3 La famille CYP3

Cette famille comprend une seule sous-famille composée de quatre membres.

La sous famille CYP3A

Cette sous-famille métabolise près de 50 % des médicaments prescrits et est la plus importante chez l'homme, d'un point de vue clinique. Elle représente environ 30 % des cytochromes hépatiques totaux (Ishizaki et Horai, 1999; Perri et coll., 1994) et est responsable du métabolisme de plusieurs xénobiotiques et substances endogènes tels que l'érythromycine, la cyclosporine, la lidocaine, les stéroïdes, et les estrogènes.

Les isoformes CYP3A4 et CYP3A5 sont les enzymes les plus abondamment exprimées chez l'humain au niveau du foie et du tractus gastro-intestinal (Nebert et Russell, 2002).

Toutefois, l'isoenzyme CYP3A4 est la plus importante chez l'homme. Cette dernière métabolise en effet plus de 120 médicaments (antibiotiques, immunosuppresseurs, anesthésiques...) et est inductible par les antibiotiques (rifampicine, troléandomycine,

sulfamidine), le phénobarbital et les glucocorticoïdes. En revanche, l'activité du CYP3A4 peut être inhibée par le jus de pamplemousse, l'érythromycine et le miconazole.

3.3 Mécanisme d'action

Le foie est le principal siège de la biotransformation des médicaments. La biotransformation est importante parce qu'elle permet d'excréter des substances hors de l'organisme et par conséquent de mettre fin à leur activité biologique (Gascon et Dayer, 1991). Le principe du métabolisme des médicaments est de convertir des drogues lipophiliques en composés plus hydrosolubles par une augmentation de leur polarité, afin de faciliter leur élimination (Watkins, 1990). En effet, la plupart des médicaments sont lipophiliques jusqu'à un certain degré à pH physiologique. Or, la bile et l'urine qui sont les principales voies d'excrétion sont de nature hydrophilique et peuvent seulement éliminer des composés hydrophiliques (Gascon et Dayer, 1991).

A l'inverse des molécules polaires qui sont souvent mal absorbées dans l'organisme mais facilement éliminées via le rein, les molécules non polaires ont de l'affinité pour les membranes et sont difficilement excrétées via le rein, à cause de leur liposolubilité. La seule façon de prévenir l'accumulation d'un médicament dans le corps est donc d'augmenter sa polarité ou son hydrophilicité afin de faciliter son élimination (Zakim et Boyer, 1990).

La biotransformation est divisée en deux phases distinctes : les réactions de phase I et celles de phase II. Les réactions de phase I sont des réactions d'oxydation (hydroxylation, désamination, N-,S- déalkylation...), de réduction ou d'hydrolyse qui convertissent la

molécule-mère en un métabolite plus polaire. Ce dernier peut être soit excrété (s'il est suffisamment polaire), soit conjugué (Gascon et Dayer, 1991). Il faut toutefois noter que la grande majorité du métabolisme de phase I est assurée par les enzymes du CYP450 (Gascon et Dayer, 1991).

Les réactions de phase II sont essentiellement des réactions de conjugaison, catalysées par des transférases. Dans ce processus, un substrat (acide glucuronique, glutathion, sulfate, acide aminé, méthyl, acétyl) est greffé sur des groupements polaires du produit, afin de former une molécule hautement polaire qui peut être excrétée dans l'urine.

Le principe du système à CYP450 est l'introduction d'un atome d'oxygène sur un substrat afin d'augmenter sa polarité. Ainsi, le CYP450 catalyse la monooxygénation des substrats à partir de l'O₂ de l'air (Zakim et Boyer, 1990). Ce processus d'oxydation suit un cycle catalytique au cours duquel un atome d'oxygène est incorporé dans le substrat et l'autre est utilisé pour la formation d'eau. Notons que dans certaines réactions de biotransformation, l'insertion de l'oxygène est une étape intermédiaire qui sert à enlever des carbones et des hydrogènes afin de diminuer la liposolubilité.

Aussi, chaque CYP450 est capable non seulement de métaboliser plusieurs médicaments mais possède également un site unique de liaison de substrat capable de lier certains médicaments (Watkins, 1990). Il existe donc à un degré moindre, une certaine spécificité de substrat. Cependant, une ou plusieurs isoenzymes différentes peuvent métaboliser le même médicament.

En effet, pour pouvoir être excrété, un médicament doit parfois passer plusieurs étapes de biotransformation. Ces étapes peuvent être catalysées par des enzymes différentes selon le type de réaction nécessaire à la transformation du composé.

On parle ainsi de voie métabolique prépondérante lorsque le métabolisme est majoritairement assuré par une isoenzyme. Il est également important de mentionner que les enzymes du CYP450 peuvent parfois générer des métabolites toxiques.

3.4 Régulation de l'activité et de l'expression du CYP450

L'expression et l'activité du CYP450 varient de façon inter- et intra-individuelle et sont influencées par différents facteurs d'ordre génétique, endogène ou environnemental. En effet, il existe un polymorphisme génétique au niveau de l'expression de certaines isoenzymes du CYP450. Aussi, l'âge, le sexe, la maladie et les habitudes de vie (nutrition, alcool, tabac, exposition à des polluants) ont également un impact sur l'activité enzymatique des isoformes du CYP450 (Ishizaki et Horai, 1999).

De plus, certaines substances peuvent également affecter l'expression et l'activité des enzymes du CYP450 en agissant comme inducteurs ou inhibiteurs enzymatiques. Nous discuterons donc dans les lignes qui suivent d'induction et d'inhibition enzymatique, ainsi que des mécanismes cellulaires impliqués.

3.4.1 Induction enzymatique

On parle d'induction enzymatique en présence d'une augmentation de la quantité d'enzymes et par conséquent de l'activité. Plusieurs substances chimiques (produits pharmaceutiques, cosmétiques, chimiques, additifs alimentaires) peuvent induire l'activité des CYP450. En plus d'être substrats d'une ou plusieurs isoenzymes du CYP450, les médicaments peuvent agir comme inducteurs enzymatiques.

En effet, beaucoup d'études montrent qu'après exposition à certains composés chimiques exogènes, l'activité des isoenzymes du CYP450 est augmentée (Watkins, 1990; Murray, 1992). Notons que cette augmentation d'activité est sélective.

L'activité de chaque isoenzyme du CYP450 est régulée de façon indépendante vis-à-vis des autres. Par exemple, l'isoniazide qui induit sélectivement le CYP2E1 est sans effet sur l'activité du CYP1A2 (Watkins, 1990). Aussi, un médicament peut être substrat d'une enzyme et inducteur d'une autre isoenzyme.

Au niveau cellulaire, l'induction enzymatique se fait selon deux mécanismes : une régulation aux niveaux transcriptionnel et post- transcriptionnel.

Le premier mécanisme se fait par l'augmentation de la transcription du gène qui code pour l'enzyme. Sous l'effet des inducteurs enzymatiques, la cellule déclenche la transcription des gènes par la liaison des facteurs de transcription à des séquences spécifiques sur leur promoteur. L'activation de la transcription entraîne à son tour une augmentation de la quantité d'ARNm et par conséquent une augmentation de la synthèse protéique par le biais de la traduction.

L'un des mécanismes d'induction le mieux connu et décrit dans la littérature est celui des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Whitlock et Denison, 1995).

Notons que les inducteurs enzymatiques activent directement des récepteurs cytosoliques ou nucléaires. Après translocation et dimérisation du complexe avec un autre récepteur ou une protéine dans le noyau, le dimère se lie au promoteur et active la transcription.

Le second mécanisme cellulaire d'induction se fait au niveau post-transcriptionnel par la stabilisation de l'ARNm ou de l'enzyme (CYP2E1, CYP3A) (Zakim et Boyer, 1990).

En effet, la quantité d'ARNm présente dans le cytoplasme dépend en partie de sa demi-vie et donc de sa vitesse de dégradation. Ainsi, en stabilisant l'ARNm, il pourra être actif plus longtemps et par conséquent augmenter la synthèse protéique.

Dans tous les cas, l'induction enzymatique conduit à une augmentation du métabolisme des médicaments et parfois à une diminution de leurs effets pharmacologiques (Gascon et Dayer, 1991).

3.4.2 Inhibition enzymatique

A l'inverse de l'induction enzymatique, l'inhibition enzymatique résulte en une diminution de la quantité d'enzyme et/ou de l'activité enzymatique.

Les médicaments peuvent également être inhibiteurs enzymatiques. Aussi, le même médicament peut être inducteur d'une isoenzyme et inhibiteur d'une autre isoenzyme.

L'inhibition enzymatique implique plusieurs mécanismes : l'inhibition de la synthèse de l'enzyme, la compétition avec un ligand pour des sites de liaison ou la formation d'un complexe inactif avec l'enzyme (Gascon et Dayer, 1991).

En effet, des substrats métabolisés par la même isoenzyme peuvent compétitionner pour le même site de liaison. De plus, lors du métabolisme des médicaments, le CYP450 peut produire soit un métabolite actif qui se lie de façon irréversible à l'enzyme, soit un métabolite intermédiaire qui se lie fortement à l'enzyme et menant ainsi à la formation d'un complexe qui inactive l'enzyme.

Les agents qui agissent directement sur l'enzyme interfèrent avec son cycle catalytique et peuvent être de deux types : les inhibiteurs réversibles compétitifs ou non-compétitifs et les inhibiteurs irréversibles ou quasi-irréversibles.

Au niveau de l'expression de l'enzyme, l'inhibition se fait par le biais de la répression transcriptionnelle des gènes. Dans ce cas, la cellule déclenche suite à un signal, une cascade d'évènements qui mène à la répression de la transcription des gènes. Cette répression peut se faire par exemple par la liaison des facteurs de transcription à des séquences de régulation négative sur le promoteur des gènes. Il faut également mentionner que des mécanismes post-transcriptionnels (diminution de la stabilité de l'ARNm) peuvent également engendrer la diminution de la quantité d'enzyme.

L'inhibition et l'induction enzymatique peuvent être la cause d'interactions médicamenteuses cliniquement significatives et ont des implications thérapeutiques (Watkins, 1990; Murray, 1992).

3.5 Effet des maladies du foie sur le métabolisme des médicaments.

Les maladies chroniques du foie telles que la cirrhose ont un impact sur le métabolisme des médicaments. En effet, plusieurs études démontrent que ces maladies sont associées avec une diminution de la biotransformation des médicaments et des substances endogènes (Murray, 1992; George et coll., 1995; Gariépy et Villeneuve, 1990).

La pathologie hépatique (cirrhose) entraîne une diminution de la masse hépatique avec une diminution du nombre d'hépatocytes et par conséquent de la quantité d'enzymes du CYP450 (Branch, 1998). En effet, l'expression des isoenzymes du CYP450 est modifiée par la maladie et certaines isoformes semblent plus susceptibles que d'autres d'être régulées de façon négative. Le contenu total de CYP450 est réduit de façon significative chez des patients cirrhotiques comparé à des patients normaux (George et coll., 1995). La conséquence de ces phénomènes est donc une diminution de la clairance des

médicaments métabolisés par le foie (George et coll., 1995; Garipey et Villeneuve, 1990).

La clairance hépatique des médicaments dépend principalement de trois facteurs : le débit sanguin hépatique qui apporte le médicament au foie, la clairance intrinsèque de l'organe (activité du système enzymatique) et la liaison des médicaments aux protéines plasmatiques. La relation entre ces variables est donnée par l'équation suivante :

$Cl_{hep} = Q \times Cl_{int} \times Fp / (Q + Cl_{int} \times Fp)$, où Cl_{hep} , Q , Cl_{int} et Fp représentent respectivement la clairance hépatique, la perfusion hépatique, la clairance intrinsèque et la fraction libre du médicament dans le plasma (c'est-à-dire non liée aux protéines plasmatiques). Une variante de cette équation est donnée par la relation

$Cl_{hep} = Q \times E$ ou E est l'extraction hépatique. (Reichen, 1995 ; Bircher et Sharifi, 1991).

D'après ces équations, l'élimination des médicaments avec une clairance intrinsèque très élevée (ratios d'extraction élevés) est limitée principalement par la perfusion hépatique. Inversement, lorsque l'extraction hépatique est faible, l'élimination des médicaments est limitée essentiellement par la clairance intrinsèque et la liaison aux protéines plasmatiques (Branch, 1998). On parle alors de médicaments débit-dépendants et débit-indépendants.

Chez les patients avec maladie chronique du foie avancée, la perfusion ainsi que la fonction hépatique est diminuée. Ceci a pour effet de changer la clairance des médicaments débit-dépendants qui se comportent alors comme des médicaments débit-indépendants. Pour les médicaments débit-indépendants, la clairance est surtout déterminée par les changements dans la capacité métabolique et la liaison aux protéines plasmatiques (Bircher et Sharifi, 1991; Garipey et Villeneuve, 1990).

En règle générale, l'insuffisance hépatique et l'hypertension portale entraînent une diminution de la capacité métabolique et donc de la clairance des médicaments. Après administration par voie orale, certains médicaments subissent un effet de premier passage important chez des sujets normaux. En présence d'une maladie hépatique, cette extraction est diminuée à cause d'une clairance intrinsèque réduite et de dérivations portosystémiques. La conséquence est une augmentation importante de la concentration sanguine, pouvant mener à de la toxicité.

De plus, la diminution de la synthèse protéique due à la maladie du foie, entraîne une diminution de la concentration d'albumine et une augmentation de la fraction libre du médicament. Ceci a des répercussions sur la clairance des médicaments fortement liés à l'albumine tels que le tolbutamide, la furosemide et le diazépam (Bircher et Sharifi, 1991).

Différentes pathologies du foie ont été étudiées et il semble que les CYP450 jouent un rôle dans la pathogenèse de certaines maladies du foie et inversement certaines pathologies hépatiques ont un effet sur la quantité et l'activité des CYP450.

Certaines hépatites médicamenteuses sont causées par la formation d'un métabolite réactif qui se lie de façon covalente aux protéines hépatocytaires. Ce métabolite entraîne une hépatotoxicité en détruisant les hépatocytes où il est formé, ou en formant un allergène qui sera reconnu par le système immunitaire. Il a été démontré que le CYP2E1 est la principale enzyme responsable de la formation du métabolite cytotoxique de l'acétaminophène, qui est la cause la plus commune d'hépatite médicamenteuse (Tonge et coll., 1998). Dans la plupart des cas, l'hépatotoxicité est augmentée par les inducteurs et diminuée par les inhibiteurs de l'isoenzyme impliquée (Villeneuve et Pichette, 2004).

L'hépatite auto-immune est associée à la présence d'auto-anticorps dans le sérum. Il en existe deux types. L'hépatite auto-immune de type II se caractérise par la présence d'anticorps microsomaux anti-foie/rein. Il a été démontré que ces anticorps sont dirigés contre l'enzyme CYP2D6. Chez des patients qui présentent une hépatite auto-immune associée au syndrome polyendocrine auto-immun de type 1, on retrouve des anticorps dirigés contre les enzymes CYP1A2 et 2A6 (Villeneuve et Pichette, 2004).

L'alcool est responsable de trois types de lésions hépatiques qui sont l'hépatite, la stéatose et la cirrhose. Il semble que le CYP2E1 joue un rôle dans la pathogenèse de la maladie. En effet, le CYP2E1 est induit par la consommation d'alcool et métabolise l'éthanol en acétaldéhyde puis en radical libre hydroxyethyl. Vidali et coll. (2003) ont suggéré que des auto-anticorps dirigés contre le complexe formé par le radical libre et l'enzyme pourraient contribuer à la lésion hépatique d'origine alcoolique. Enfin, il a également été suggéré que les espèces intermédiaires réactives en oxygène (générés par le CYP2E1) causent un dommage au niveau mitochondrial, suivi de l'activation de caspase et menant éventuellement à une mort cellulaire par apoptose (Villeneuve et Pichette, 2004).

La stéatohépatite non-alcoolique (NASH) est une pathologie semblable aux maladies hépatiques d'origine alcoolique. Elle semble se produire en association avec le diabète, l'obésité et une hypertriglycéridémie. Il a été démontré que la quantité et l'activité du CYP2E1 sont augmentées chez les patients présentant cette maladie. Aussi, cette enzyme semble jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie par un mécanisme semblable à celui des maladies hépatiques d'origine alcoolique (formation d'espèces réactives en oxygène).

Finalement, plusieurs études ont montré démontré une diminution de l'expression et de l'activité de plusieurs enzymes chez les patients avec cirrhose. En effet, Coverdale et coll. (2003) ont observé une diminution de la clairance des médicaments substrats du CYP1A2 (caféine et théophylline) chez des patients cirrhotiques. Aussi, une diminution de 30% au niveau de l'expression du CYP1A a été observée chez des patients avec cirrhose (Villeneuve et Pichette, 2004).

George et coll. (1995) ont observé une réduction de l'activité et de l'expression du CYP3A4 chez des patients avec cirrhose. Enfin, plusieurs études dont celle de Arns et coll. (1997) ont montré une réduction de la clairance des substrats du CYP2C19.

En revanche, Lown et coll. (1992) ont constaté que la quantité du CYP2E1 était inchangée chez des patients avec cirrhose.

En résumé, la cirrhose entraîne une diminution de l'activité et de l'expression des CYP450. Toutefois, cette diminution ne se fait pas de façon uniforme.

CHAPITRE 4

TESTS QUANTITATIFS DE LA FONCTION HEPATIQUE

4. TESTS QUANTITATIFS DE LA FONCTION HEPATIQUE

Les maladies du foie sont associées à divers degrés à une détérioration de la fonction hépatique. Cependant, il n'existe aucun test de laboratoire analogue à celui de la mesure de la filtration glomérulaire pour les maladies rénales, qui permette de mesurer avec précision la réserve fonctionnelle hépatique (Villeneuve et coll., 1983).

Comme le métabolisme des médicaments est l'un des principaux rôles du foie, des médicaments modèles ont été proposés comme tests quantitatifs de la fonction hépatique (Villeneuve et coll., 1986). Nous décrirons ici brièvement les tests les plus utilisés, puis discuterons succinctement des autres tests.

4.1 Prédiction du métabolisme des médicaments

Afin de prédire le métabolisme des médicaments, différents composés ont été évalués (Reichen, 1995). Les médicaments sont métabolisés par les isoenzymes du cytochrome P450. Une seule ou plusieurs isoenzymes peuvent être impliquées dans ce processus de biotransformation, mais pour certains médicaments il existe une voie métabolique majeure ou prédominante, catalysée par une seule isoenzyme du CYP450. Les maladies du foie sont fréquemment associées avec une réduction du métabolisme des médicaments (Wilkinson et Schenker, 1975). La meilleure façon de prédire le métabolisme d'une drogue semble donc d'étudier la drogue en question.

Or, il a été démontré qu'un médicament modèle permet de prédire fidèlement le comportement de médicaments médiés par la même isoenzyme. (Watkins et coll., 1990; Turgeon et coll., 1994).

Le phénotypage des enzymes du CYP450 avec des sondes spécifiques permet donc d'obtenir de l'information sur leur activité (Streetman et coll., 2000). Les patients avec des CYP450 défectueux ont par exemple des risques de développer des réactions secondaires aux médicaments.

Divers médicaments ont été proposés comme tests quantitatifs de la fonction hépatique. La clairance hépatique (qui est fonction de la perfusion et de l'extraction) constitue la base pour la plupart de ces tests (Reichen, 1995). Comme nous l'avons mentionné, certains médicaments ont en effet une clairance hépatique dite débit-dépendante et d'autres, une clairance débit-indépendante. Lorsque la clairance intrinsèque du foie est élevée, la clairance hépatique est linéairement dépendante de la perfusion hépatique. En revanche, lorsque la clairance intrinsèque est faible, la clairance hépatique ne dépend pas de la perfusion et l'élimination du composé est limitée uniquement par l'activité enzymatique et la liaison aux protéines plasmatiques (Reichen, 1995).

Il devient par conséquent évident qu'en présence d'une maladie foie, un médicament débit-dépendant peut se comporter comme un médicament débit-indépendant à cause des faibles coefficients d'extraction, qui sont dus à une diminution de la clairance intrinsèque (Reichen, 1995). C'est en tenant compte de tous ces paramètres ainsi que des différents facteurs pouvant influencer l'activité d'une isoenzyme du CYP450 que des médicaments modèles ont été retenus comme sondes métaboliques de différents cytochromes P450. Le médicament idéal doit être sécuritaire, facilement mesurable et dépourvu d'influences environnementales et génétiques.

4.2 Revue des médicaments modèles

Le phénotypage constitue une méthode optimale pour décrire l'activité réelle d'une enzyme. De plus, il reflète les effets combinés des facteurs génétiques, environnementaux et endogènes sur cette activité (Streetman et coll., 2000). Différentes sondes ont donc été évaluées pour chaque isoenzyme du CYP450. Leurs avantages et inconvénients ont été notés puis comparés entre eux afin de déterminer la meilleure sonde pour l'isoenzyme étudiée.

Nous ne parlerons que des sondes spécifiques aux 4 isoenzymes que nous avons étudiées dans ce mémoire. Ainsi, la caféine est la sonde qui offre le plus d'avantages pour phénotyper le CYP1A2, comparée à la théophylline. De plus, elle est sécuritaire. L'oméprazole est une alternative potentielle pour remplacer la méphénytoïne comme standard pour phénotyper le CYP2C19. Ce dernier posait en effet des problèmes de stabilité des échantillons et de sécurité (effets secondaires). La chlorzoxazone demeure à ce jour la sonde qui a été la plus étudiée pour phénotyper le CYP2E1. Toutefois, des questions concernant l'implication d'autres enzymes ont diminué son utilisation comme sonde fiable du CYP2E1. Quant au CYP3A, l'érythromycine et le midazolam qui ont été les plus rigoureusement étudiés semblent être les sondes les plus fiables. Cependant, des controverses demeurent sur le choix de la sonde idéale (Streetman et coll., 2000).

L'utilisation de cocktails métaboliques pour le phénotypage est de plus en plus fréquente. En effet, l'administration individuelle de sondes métaboliques nécessite plusieurs sessions expérimentales, avec des complications pour évaluer l'activité de multiples enzymes importantes pour le métabolisme des médicaments. Or, l'administration d'un cocktail métabolique constitué de plusieurs sondes permet

d'obtenir les mêmes informations en une seule expérience puis de minimiser l'influence de la variabilité intra-individuelle dans le temps (Frye et coll., 1997).

Il est cependant important de s'assurer qu'il n'existe pas d'interactions métaboliques, ni d'interférence analytique lorsque les sondes sont administrées simultanément. Plusieurs cocktails métaboliques ont ainsi été validés en comparant le métabolisme des sondes lorsqu'elles sont administrées seules versus en cocktail. On peut citer en exemple le cocktail de Pittsburgh (Frye et coll., 1997), puis ceux validés par Streetman et coll. (2000) et Zhu et coll. (2001). Le cocktail de Pittsburgh comprend la caféine, la S-méphénytoïne, la chlorzoxazone, la débrisoquine et la dapsone et permet de phénotyper respectivement les CYP450 1A2, 2C19, 2E1, 2D6 et 3A4. Quant au cocktail validé par Streetman et coll., il comprend la caféine, l'oméprazole, le dextrométorphan et le midazolam et phénotype respectivement les CYP450 1A2, 2C19, 2D6 et 3A4. Enfin, le cocktail validé par Zhu et coll. comprend la caféine, la S-méphénytoïne, la chlorzoxazone, le métoprolol et le midazolam et permet de phénotyper les CYP450 1A2, 2C19, 2E1, 2D6 et 3A4 respectivement.

4.3 Avantages et importance des tests

Les tests quantitatifs de la fonction hépatique ne faisaient pas partie auparavant de la routine clinique et étaient considérés comme peu importants (Bircher, 1983). Différentes études ont cependant démontré leur importance clinique.

En effet, il est bien connu que la plupart des maladies du foie passent par une phase compensée (symptômes non spécifiques et minimaux) avant d'atteindre la décompensation où la maladie est à un stade très avancé et la détérioration rapide

(Bircher, 1983). Il est donc important de détecter la maladie à un stade précoce de sa progression, avant que la décompensation se produise. Or, les tests quantitatifs de la fonction hépatique peuvent nous informer du stade et de la vitesse de progression de la maladie bien avant la décompensation (Bircher, 1983).

Ils ont donc un potentiel pronostic et diagnostic. La valeur pronostique de différents tests de clairance a en effet été prouvée dans diverses conditions (Reichen, 1995 ; Perri et coll., 1994). Certains tests se sont d'ailleurs révélés supérieurs aux tests conventionnels dans la prédiction de la survie et la sévérité (Reichen, 1995; Bircher, 1983). Aussi, non seulement leur utilisation permet l'évaluation de nouvelles interventions thérapeutiques à tout stade de la maladie mais encore, ils peuvent être utilisés comme substitut de marqueurs dans les essais cliniques contrôlés pour mesurer les effets d'un traitement sur le foie (Lotterer et coll., 1997). De plus, ils permettent de réduire la taille des échantillons et le temps d'observation dans les essais cliniques : ce qui réduit le nombre et le risque d'abandon, puis le coût.

Finalement, ces tests peuvent rendre les essais cliniques contrôlés plus efficaces car ils permettent de caractériser la population de patients inclus dans l'étude (afin d'avoir des groupes plus homogènes) et aussi de définir les points finaux à considérer pour déterminer le succès ou non d'un nouveau traitement (Bircher, 1983).

Enfin, ces tests sont aussi utiles pour adapter la dose d'un traitement à un patient (Bircher, 1983) et déterminer le temps optimal pour une transplantation.

4.4 Test d'exhalaison de l'aminopyrine et de l'érythromycine

Les tests d'exhalaison de l'aminopyrine (ABT) et de l'érythromycine (EBT) sont des tests fréquemment utilisés en clinique. Ils permettent d'explorer l'activité des isoformes du cytochrome P450. Le principe de ces deux tests est à peu près le même. Les méthodes sont décrites en détail dans la littérature (Perri et coll., 1994; Villeneuve et coll., 1983; Watkins et coll., 1989). Nous parlerons uniquement de l'ABT puisque l'EBT est décrit dans la section sujets et méthodes.

En résumé, après une nuit de jeûne, les sujets reçoivent de l'aminopyrine marquée au ^{14}C par voie orale ou par voie i.v. Le $^{14}\text{CO}_2$ (produit final du métabolisme) expiré dans l'air est recueilli dans des vials de 4 ml contenant un mélange d'hydroxyde d'hyamine et d'éthanol (1:1) et un indicateur bleu. Lorsque la couleur bleue disparaît, cela indique que 2 mmoles de CO_2 ont été captées. Après l'ajout d'un liquide de scintillation, la radioactivité des échantillons est déterminée par décompte de radiation. Les résultats sont exprimés comme pourcentage de la dose administrée et l'excrétion cumulative de $^{14}\text{CO}_2$ sur la période étudiée est calculée en assumant une valeur constante de vitesse de production de CO_2 endogène. Les échantillons sont recueillis toutes les heures pendant 2 ou 6 heures. Plusieurs isoenzymes du CYP450 médient la déméthylation de l'aminopyrine alors que l'EBT phénotype le CYP3A4. Tous les deux mesurent une activité N-déméthylase. L'ABT a une bonne valeur pronostique et est non invasif.

4.5 Les autres tests

Il existe d'autres tests quantitatifs de la fonction hépatique. La clairance de la caféine mesure la concentration de la caféine dans le sang ou la salive pendant 24 heures après une administration orale de la substance. La clairance de l'antipyrine mesure la concentration de l'antipyrine dans le sang ou la salive également pendant 24 heures après une administration orale de la drogue. La clairance de la lidocaïne mesure la concentration sérique de la substance-mère et de son métabolite principal, le monoethylglycine-xylidide (MEG-X) 15 minutes après une administration par voie i.v. Le test de capacité d'élimination du galactose (GEC) mesure le métabolisme du galactose avec une série d'échantillons sanguins, collectés de 20 à 50 minutes après une injection i.v. Il existe également d'autres tests dont nous ne discuterons pas, tels que le BSP et l' ICG. L'utilité de chacun de ces tests est résumée dans la littérature (Reichen, 1995; Pratt et Kaplan, 1999).

En général, pour la plupart des tests, on administre les médicaments par voie orale ou i.v puis on recueille les échantillons sanguins et/ou les gaz expirés sur la durée de l'étude. Il est à noter que l'activité d'un CYP450 est reflétée par le rapport de concentration du métabolite principal sur celui de la substance-mère.

DEUXIÈME PARTIE

SUJETS ET METHODES

Objectifs de l'étude

Objectifs généraux

Le but de cette étude est de caractériser l'activité de différentes isoenzymes du cytochrome P450, en particulier celle du CYP 2C19 chez des patients avec maladie du foie, puis de déterminer comment la sévérité et l'étiologie de la maladie affectent cette activité.

Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques de cette étude sont tout d'abord de valider chez des sujets sains un cocktail de phénotypage des cytochromes P450 1A2, 2C19, 2E1 et 3A4 en déterminant si l'ajout de l'oméprazole (une sonde validée du CYP 2C19) à un cocktail métabolique déjà validé de 3 sondes (caféine, érythromycine et chlorzoxazone), permet de phénotyper correctement et simultanément l'activité de ces 4 isoenzymes. En second lieu, il s'agit d'administrer ce cocktail de phénotypage à des patients présentant une maladie chronique du foie puis d'évaluer leur fonction hépatique à travers l'activité de ces mêmes isoenzymes.

Sujets et Méthodes

Sujets sains

Population étudiée

Dix-sept sujets sains dont 7 hommes et 10 femmes, âgés de 21 à 54 ans (moyenne de 33.8 ans) ont été étudiés. A l'exception d'un asiatique, tous étaient de race blanche. Quatre des 10 femmes prenaient un contraceptif hormonal et aucun des sujets n'était

fumeur. Les tests de laboratoire habituels (biochimie et hématologie) ont été effectués pour s'assurer que leurs fonctions rénale et hépatique étaient normales. Les sujets souffrant d'alcoolisme chronique, prenant des médicaments de façon chronique (incluant les inhalateurs et les produits naturels), des drogues, ainsi que les femmes enceintes ou qui allaitent ont été exclus de cette étude.

Patients avec maladie du foie

Population étudiée

Cent-cinq patients dont 74 hommes et 31 femmes, âgés de 17 à 76 ans (moyenne de 55.2 ans) ont été étudiés. Tous étaient de race blanche à l'exception de deux noirs et 2 orientaux. Parmi ces sujets, 79 avaient une cirrhose et 26 avaient reçu une transplantation orthotopique du foie (post-TOF) pour une cirrhose due à l'hépatite C. Ces derniers avaient tous une récurrence de l'hépatite C. L'intervalle de temps entre la greffe et le protocole expérimental était de 8.8 mois à 127.4 mois (moyenne de 45.6 mois). Étant donné leur état de santé, ainsi que la nature de leur maladie, la prise de médicaments de façon chronique était permise.

Évaluation de la sévérité de la maladie hépatique

La sévérité de la maladie hépatique des patients a été évaluée à l'aide du score de Child-Pugh (Pugh et coll., 1973). Le score de Pugh qui définit 3 stades de gravité croissante est calculé en attribuant des points à 5 critères selon le tableau II (p.19).

Le score est obtenu pour chaque malade en additionnant les points. Ce score peut aller de 5 à 15. Les patients ayant un score de 5 à 6, 7 à 9 ou 10 à 15 appartiennent

respectivement aux classes A, B et C. Ils se classent respectivement comme suit : bonne fonction hépatique, altération modérée de la fonction hépatique et insuffisance hépatique avancée.

Consentement éclairé

Le protocole de recherche a été approuvé par les comités d'éthique et scientifique du CHUM. Avant de participer à cette étude, tous les sujets ont donné leur consentement éclairé écrit.

Protocole expérimental

Étude chez les sujets sains

Le but était de vérifier si l'ajout de l'oméprazole à un cocktail métabolique de 3 sondes permettait d'évaluer simultanément et correctement l'activité de quatre CYP450. Cette étude était prospective, randomisée en chassé-croisé.

Les sujets sont venus au centre de recherche à trois reprises, chaque visite étant espacée d'une semaine. Quarante-huit heures avant chaque visite, les sujets devaient s'abstenir de consommer du jus de pamplemousse ou du pamplemousse. Pendant les 24 heures précédant le test, ils ne devaient consommer ni alcool, ni thé, ni café, ni chocolat et ni caféine. Le jour du test, ils devaient être à jeun depuis minuit mais étaient autorisés à manger deux heures après le début de celui-ci.

Lors des visites, les sujets ont reçu de façon aléatoire l'une des médications suivantes :

Visite 1	un comprimé de 20 mg d'oméprazole (Losec, Astra Zeneca, Mississauga, ON) par voie orale (p.o)
Visite 2	un cocktail métabolique comprenant une solution de caféine (Sigma Chemical, St-Louis, MO) 10 mg/ml d'eau et dosée à 2 mg/kg p.o., un comprimé de 250 mg de chlorzoxazone (Teva Pharmaceutical, Sellersville, PA) p.o. et une injection par voie intraveineuse (i.v) de 3 μ Ci d'érythromycine marquée au ^{14}C ($[^{14}\text{C}]$ N-méthyl-érythromycine) (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA)
Visite 3	l'oméprazole et le cocktail métabolique

Des prélèvements sanguins ont été effectués à chaque visite, aux temps 0, 2 et 4 heures avec des tubes à bouchon gris et rouge (Vacutainer SST-gel & clot activator, B-D, Franklin Lakes, NJ). Par la suite, ces échantillons sanguins ont été centrifugés pendant 10 minutes à 2900 tours/minute, après les avoir laissé reposer 30 minutes à température de la pièce. Les sérums ainsi obtenus ont été congelés à -80°C jusqu'au jour de leur analyse.

Un recueil des gaz expiratoires a été effectué toutes les 15 minutes pendant 1 heure aux temps 0, 15, 30, 45 et 60 minutes, selon la méthode décrite par Watkins et coll. (1989) pour la mesure du métabolisme de l'érythromycine marquée au ^{14}C .

À chaque intervalle de temps, le sujet devait expirer par la bouche en soufflant dans de petits vials (Fisher Scientific, Nepean, ON) contenant 4 ml d'un mélange d'éthanol et d'hydroxyde de benzothénium (1:1) (Sigma Aldrich), auquel a été ajouté 100 µl de phénolphtaléine, un indicateur bleu. Le sujet devait donc faire barboter le mélange jusqu'à ce que la coloration bleue disparaisse ; indiquant ainsi que 2 mmoles de dioxyde de carbone ont été captées.

Étude chez les sujets avec maladie du foie

Cette étude était prospective, ouverte et à dose unique. Le but était d'évaluer la fonction hépatique de patients présentant une maladie du foie, avec le cocktail métabolique validé chez les sujets sains. Le protocole suivi était le même que celui utilisé pour les sujets sains à l'exception des points cités ci-dessous :

Les sujets devaient s'abstenir de consommer du café, thé, chocolat et caféine pendant 48 heures au lieu de 24 heures. En plus d'être à jeûn, ils ne devaient prendre aucun médicament le jour du test. Toutefois, ils étaient autorisés à prendre ces derniers au moment de manger, soit deux heures après le début du test. Des tests standards de laboratoire pour la fonction hépatique ont aussi été effectués au temps 0. La liste de leur médication était notée. A la différence des témoins sains, les patients sont venus au centre de recherche une seule fois où ils ont reçu les 4 médicaments simultanément.

Dosage des échantillons

Les concentrations sériques des substances administrées ont été quantifiées par H.P.L.C (HP-Agilent, 1100 series d'Agilent Technologies) selon les méthodes décrites dans la

littérature et résumées plus bas. Ainsi, les concentrations plasmatiques des substances-mères (caféine, oméprazole et chlorzoxazone) et celles de leurs métabolites ont été mesurées. Il est à noter que les quatre sondes métaboliques utilisées, soit l'oméprazole, la caféine, l'érythromycine et la chlorzoxazone permettaient d'évaluer l'activité enzymatique des cytochromes P450 2C19, 1A2, 3A4 et 2E1 respectivement.

Essai H.P.L.C de l'oméprazole

La méthode de dosage a été développée à partir de celles décrites dans la littérature par Kobayashi et coll. (1992) et Amantea et Narang (1988). La phase mobile utilisée était composée de méthanol /acétonitrile /tampon phosphate 0.025M, pH 7.4 (40% :8% :52%) à un débit de 1.2 ml/min en mode isocratique. La colonne utilisée était une Zorbax SB-C 18 de 5 µm (Agilent Technologies, Wilmington, DE) avec une pré-colonne de même matériel (Agilent Technologies). La durée d'un essai était de 23 minutes, la pression de 259 Bar et la température de 25°C. Le détecteur était un DAD (Diode Array Détecteur) à 302 nm.

Préparation des standards.

A partir de solutions stock (100 µg/ml dans méthanol) d'oméprazole et des métabolites (hydroxy-oméprazole et oméprazole-sulphone), des solutions de travail (10 µg/ml dans tampon carbonate de sodium 0.1M, pH 9.8) ont été préparées pour chaque analyte (Astra Zeneca R&D, Molndal Sweden). Les standards pour la courbe de calibration ont été préparés en ajoutant à 1 ml de plasma (sans drogue) différents volumes des solutions de travail de l'oméprazole et ses métabolites, afin d'obtenir différentes concentrations. Une courbe de cinq standards allant de 25 à 500 ng/ml a ainsi été obtenue.

Extraction

Après avoir prélevé 1 ml des sérums à analyser, 50 µl de standard interne H_{168/24}, 5 ml de dichlorométhane (Fisher Scientific, Nepean, ON), 0.25 g de sel et 500 µl de tampon phosphate 0.5 M, pH 8.0 ont été ajoutés à tous les tubes. Les tubes ont ensuite été agités 10 minutes, mis 5 minutes sur la glace à température ambiante puis centrifugés 30 minutes à 4°C et à 1600 g (3000 rpm). Le surnageant (phase aqueuse) a été aspiré et la phase organique transférée dans des tubes en verre 16 x 100 mm (Fisher Scientific) puis évaporée sous azote à 40°C. Les résidus ont été resuspendus dans 200 µl de phase mobile puis les tubes ont été vortexés et centrifugés quelques secondes pour concentrer la phase mobile dans le fond. Le contenu de chaque tube a été filtré directement dans l'insert de la bouteille (Agilent Technologies) à l'aide d'une seringue avec aiguille (Magasin HSL, Montreal, QC) puis des filtres Milex 0.45 µm (Fisher Scientific). Cent µl des filtrats ont été injectés dans l'appareil HPLC en prenant soin de faire laver l'aiguille entre chaque essai, puis la colonne a été lavée à la fin.

Essai HPLC de la Chlorzoxazone

Les échantillons ont été dosés selon la méthode décrite par Frye et coll. (1996). La phase mobile était composée d'acétate d'ammonium 0.1M/ acétonitrile/tetrahydrofuran (72% :22.5% :5.5%) à un débit de 1.1 ml/min en mode isocratique. La colonne était une µ Bondapak C-18, de 3.9 x 300 mm avec une pré-colonne de même matériel (Waters Corporation, Milford, MA). La durée d'un essai était de 20 minutes avec une pression de 110 Bar. Un détecteur UV à 283 nm a été utilisé.

Préparation des standards

A partir de solutions stock (1 mg/ml dans méthanol) de la chlorzoxazone, de son métabolite principal (6-OH-CXZ) (Sigma Aldrich) et du standard interne DMSP (Sigma Aldrich), des solutions de travail (50 et 10 µg/ml pour la CXZ et la 6-OH-CXZ puis 12.5 µg/ml pour le DMSP) ont été préparées en faisant des dilutions dans du tampon phosphate 80 mM , pH 6.8. Les standards pour la courbe de calibration ont été préparés en ajoutant à 200 µl de sérum, différents volumes de la CXZ et son métabolite, de façon à obtenir différentes concentrations. Le volume final des tubes a ensuite été complété à 300 µl avec du tampon phosphate. Une courbe de 11 standards allant de 50 à 3000 ng a ainsi obtenue.

Déconjugaison

0.2 ml des sérums à analyser et 100 µl de β-glucuronidase (Sigma Aldrich) ont été incubés 3 heures à 37°C dans des tubes Eppendorfs, afin de permettre la déconjugaison des substances à quantifier, qui sont sous forme conjuguée.

Extraction

Après avoir ajouté 1ml d'éther (Sigma-Aldrich) et 20 µl du standard interne à tous les tubes, ceux-ci ont été vortexés 30 secondes puis laissés reposer 1 minute. La phase éther a été prélevée dans des tubes 10x 75 mm (Magasin HSL) puis évaporée sous azote à 40°C. 200 µl de phase mobile ont été ajoutés pour la reconstitution, puis les tubes ont été vortexés. Le contenu de chaque tube a ensuite été transféré avec un pipetman dans l'insert des bouteilles puis 100 µl ont été injectés dans l'appareil HPLC. A la fin de la séquence, la colonne a été lavée.

Essai HPLC de la Caféine

Les échantillons ont été dosés selon la méthode décrite par Tanaka (1992).

La phase mobile était composée de méthanol/acide acétique 0.05% (12% :88%)

La colonne utilisée était une Ultrasphère ODS, de 4.6 x 250 mm (Beckman Instruments, Fullerton, LA) avec une pré-colonne Zorbax SB-C18 5 µm (Agilent Technologies). Le débit était de 1.2 ml/min de 0 à 30 minutes, 2.5 ml/min de 30 à 75 minutes puis de 1.2 ml/min de 75 à 78 minutes. La durée d'un essai était de 78 minutes et le détecteur était à 270 nm.

Préparation des standards

A partir de poudre des cinq analytes (Sigma Aldrich), des solutions de travail (20 µg/ml dans l'eau) de théobromine, paraxanthine, théophylline (10 µg/ml dans l'eau), caféine (20 et 40 µg/ml dans l'eau) et du standard interne chlorothéophylline (10 µg/ml dans l'eau) ont été préparées. Les standards pour la courbe ont été préparés en ajoutant à tous les tubes 500 µl de sérum de chien, 100 µl de standard interne, 100 µl de HCl 1N et différents volumes de la caféine et ses trois métabolites, de façon à obtenir différentes concentrations de chaque analyte. Pour le tube témoin, aucun analyte n'a été ajouté. Une courbe de 5 standards allant de 0 à 2000 ng, de 0 à 1000 ng, de 0 à 500 ng, et de 0 à 3000 ng pour la théobromine, la paraxanthine, la théophylline et la caféine respectivement a ainsi été obtenue. Toutefois, 150 µl (6000 ng) et 290 µl (11600 ng) de caféine à 40 µg/ml ont respectivement été ajoutés à deux tubes supplémentaires contenant les mêmes volumes de métabolites que dans les tubes 4 et 3. Le volume final de tous les tubes a alors été complété à 1.2 ml avec de l'eau.

Extraction

Après avoir prélevé 500 µl des sérums à analyser puis ajouté 100 µl de HCl 1N et 100 µl de standard interne, 4 ml de dichlorométhane ont été ajoutés à tous les tubes. Ceux-ci ont ensuite été agités 5 minutes puis centrifugés 10 minutes à 2500 rpm et à température de la pièce. Le surnageant (phase aqueuse) a alors été aspiré et la phase organique transférée dans des tubes en verre 16 x 100 mm, puis évaporée sous azote à 40°C. Les tubes ont été vortexés après l'ajout de 150 µl de phase mobile pour la resuspension. Le contenu de chaque tube a finalement été placé dans une bouteille contenant un insert puis 100 µl ont été injectés. A la fin de la séquence, la colonne a été lavée.

Dosage du $^{14}\text{CO}_2$ provenant de l'Erythromycine

Dix ml de Hionic Fluor(Canberra Packard) ont été ajoutés à chaque vial puis les échantillons ont été vortexés quelques secondes pour rendre le mélange homogène. La quantité de $^{14}\text{CO}_2$ expirée a été déterminée par décompte des radiations à l'aide d'un compteur de type Beckman LS 1801.

Définition des variables

Le dosage des échantillons a permis de mesurer les concentrations sériques de chaque sonde et ses métabolites. A partir de ces données, des ratios métaboliques ont été calculés pour chaque sonde. Pour l'érythromycine, le pourcentage de la dose administrée, expirée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ en 1 heure a été calculé en faisant le rapport de la quantité de radioactivité récupérée sur la quantité de radioactivité administrée. Les ratios métaboliques utilisés sont définis dans le tableau III .

Tableau III : Définition des rapports métaboliques utilisés

CYP 450	Marqueur	Rapport métabolique
CYP 1A2	Caféine P.O.	Cs paraxanthine / Cs caféine à 4 heures
CYP 2C19	Oméprazole P.O.	Cs 5-hydroxyoméprazole / Cs oméprazole aux Cs maximales
CYP 2E1	Chlorzoxazone P.O .	Cs 6-hydroxychlorzoxazone / Cs Chlorzoxazone à 4 heures
CYP 3A4	Érythromycine I.V.	% de la dose administrée expirée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ en 1 heure

Cs : concentrations sériques

Analyses statistiques

Sujets sains

Le calcul de la taille de l'échantillon requis, à l'aide du logiciel PASS 2000 (NCSS Stistical Software, Kaysville, UT), a permis d'évaluer la taille d'échantillon à 16 sujets avec une erreur alpha de 5%, une puissance de 80% et une différence entre les moyennes considérée significative à 5%. Pour la même sonde, chaque sujet avait deux valeurs de ratios métaboliques calculées. Les valeurs des ratios métaboliques du même patient en fonction de la visite, ont été portées graphiquement (à l'aide du logiciel Origin 4.1) pour chaque sonde. Les moyennes obtenues lors de chaque visite, ont alors été comparées. La différence entre les moyennes obtenues a été évaluée à l'aide d'un

test statistique de t-pairé (NCSS 2000, NCSS Statistical Software, Kaysville, UT) et ce, pour chaque sonde.

Patients

Après avoir séparé ou subdivisé les patients en groupes, les valeurs de leurs ratios métaboliques ont été portés graphiquement avec celles des témoins sains, pour chaque sonde. Les différents groupes ont été comparés entre eux par une analyse de variance (ANOVA), suivie du test de comparaisons multiples Tukey-Kramer. Les différences entre les moyennes étaient considérées significatives lorsque $P < 0.05$. La corrélation entre l'oméprazole et les autres sondes du P450 chez les sujets sains, les patients avec cirrhoses et les patients post-TOF a été étudiée. A cet effet, des courbes de corrélation entre les ratios de l'oméprazole et ceux des différentes sondes du CYP450 ont été tracées pour les différents groupes. La corrélation entre les autres sondes du CYP450 a aussi été étudiée chez ces mêmes groupes.

TROISIÈME PARTIE

RÉSULTATS

RÉSULTATS

Sujets sains

Les données biochimiques et hématologiques des sujets sains sont résumées dans le tableau IV. Les fonctions hépatique et rénale des sujets étaient normales.

Tableau IV: Données biochimiques et hématologiques des sujets sains (n=17).

	Moyenne \pm écart-type
Créatinine sérique($\mu\text{mol/L}$)	68.5 \pm 11.8
Albumine (g/L)	40.1 \pm 2.5
Bilirubine ($\mu\text{mol/L}$)	13.5 \pm 2.7
AST (U/L)	19.4 \pm 3.2
ALT (U/L)	18.1 \pm 4.9
Phosphatase alcaline(U/L)	57.7 \pm 18.3
RNI	1.0 \pm 0.1
Leucocytes ($\text{X}10^9/\text{L}$)	6.3 \pm 1.0
Hémoglobine (g/L)	142 \pm 13
Neutrophiles ($\text{X}10^9/\text{L}$)	3.7 \pm 1.1
Plaquettes ($\text{X}10^9/\text{L}$)	250 \pm 53

Les restrictions de l'étude ont bien été respectées et aucun effet secondaire n'a été observé. En revanche, un sujet a utilisé du fluticasone en vaporisateur nasal à une

occasion et deux sujets ont pris de l'acétaminophène la veille d'une des visites. Aucune interférence chromatographique n'a été observée lors du dosage des échantillons.

Les concentrations sériques obtenues lors du dosage de l'oméprazole et ses métabolites ont posé certains problèmes en raison d'une absorption erratique de l'oméprazole. Selon les données de la littérature, les ratios métaboliques de l'oméprazole sont calculés à partir des concentrations obtenues à 2, 3 ou 4 heures après la prise du médicament. (Kovacs et coll., 1999; Chang et coll., 1995; Marinac et coll., 1996). Or, chez certains sujets de notre étude, les concentrations sériques d'oméprazole et d'hydroxy-oméprazole étaient indétectables au temps 2 heures. De plus, les concentrations maximales d'oméprazole et 5-OH-oméprazole ont été obtenues à des temps variables. En effet, sur un total de 34 prises d'oméprazole, 14 ont donné des concentrations plus élevées à 4 heures qu'à 2 heures. Parmi ces 14 prises, 12 étaient sous la limite de détection (25 ng/ml) pour l'oméprazole et l'OH-oméprazole à 2 heures. De plus, seulement 4 des 17 sujets ont atteint leur pic des concentrations au même moment lors des 2 visites. A la lueur de ces observations, les ratios métaboliques à un temps donné ne pouvaient pas être comparés entre eux. Nous avons donc choisi de calculer le ratio métabolique de l'oméprazole en utilisant les données obtenues au temps des concentrations maximales.

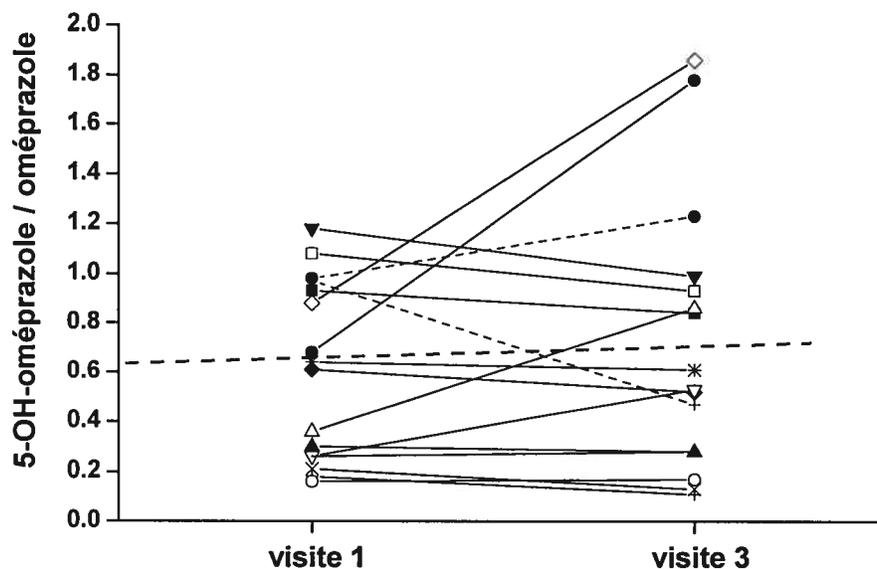
Un sujet a été exclu de l'analyse pour l'oméprazole car il avait des concentrations indétectables aux temps 2 et 4 heures lors d'une des visites.

Pour les autres sondes (caféine, érythromycine, chlorzoxazone), les résultats de tous les sujets étaient analysables. Certains sujets avaient des taux (bien que faibles) de caféine ou de paraxanthine décelables au temps 0, et ce même s'ils affirment ne pas avoir consommé de caféine pendant un jour. Pour la chlorzoxazone, un sujet a également été

exclu de l'analyse parce qu'il présentait un taux très élevé de 6-OH-CXZ au temps 0 et ce taux est resté élevé aux temps 2 et 4 heures.

Les ratios métaboliques obtenus avec chaque sonde, en fonction de la visite et pour un même patient sont présentés aux figures 1 à 4. Les lignes relient le même patient d'une visite à l'autre et chaque patient est représenté par un point. D'une façon générale, on peut dire qu'il ne semble pas y avoir une grande différence entre les ratios obtenus à chaque visite pour le même patient. Les moyennes des ratios métaboliques obtenues lors de chaque visite sont comparées entre elles, pour chaque sonde dans le tableau V.

Figure 1: Rapport métabolique de l'oméprazole au temps d'obtention des concentrations sériques maximales (n = 16).

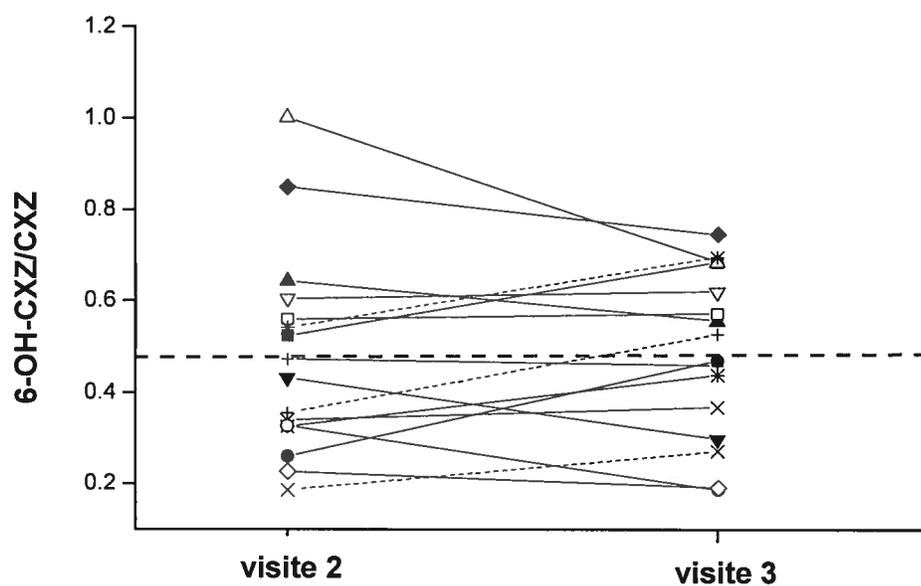


Visite 1: oméprazole

Visite 3: caféine, oméprazole, chloroxazone et érythromycine

---- : moyenne

Figure 2: Rapport métabolique de la chlorzoxazone au temps 4 heures (n = 16)

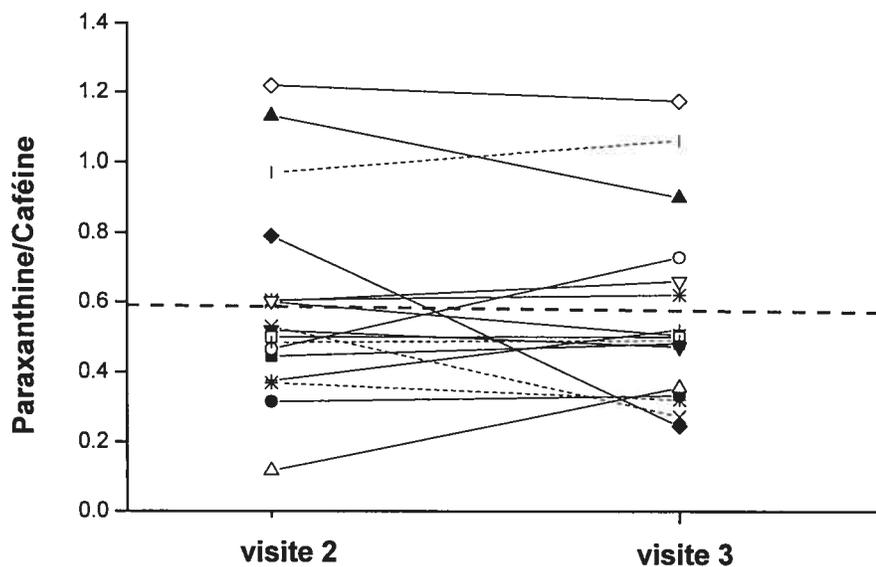


Visite 2: caféine, chlorzoxazone et érythromycine

Visite 3: caféine, oméprazole, chlorzoxazone et érythromycine

----: moyenne

Figure 3: Rapport métabolique de la caféine au temps 4 heures (n = 17)

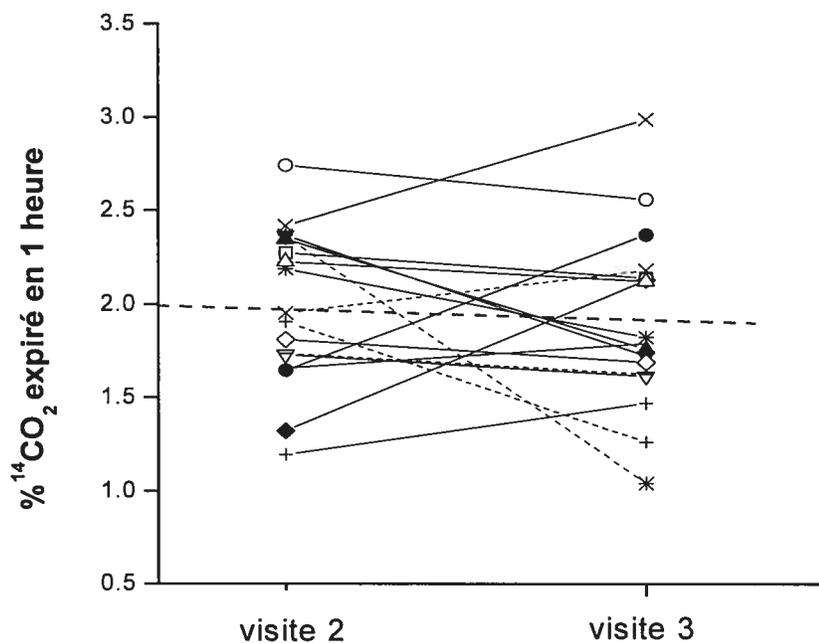


Visite 2: caféine, chlorzoxazone et érythromycine

Visite 3: caféine, oméprazole, chlorzoxazone et érythromycine

----: moyenne

Figure 4: Test respiratoire à l'érythromycine: pourcentage de la dose administrée expirée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ en 1 heure (n = 17)



Visite 2: caféine, chlorzoxazone et érythromycine

Visite 3: caféine, oméprazole, chlorzoxazone, érythromycine

----: moyenne

Tableau V : Comparaison des rapports métaboliques obtenus.

Enzyme	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Différence des Moyennes (IC _{95%})	P
CYP 1A2	N/A	0.591 ± 0.288	0.568 ± 0.268	0.023 (-0.075-0.121)	0.627
CYP 2C19	0.605 ± 0.360	N/A	0.725 ± 0.541	-0.120 (-0.344-0.104)	0.272
CYP 2E1	N/A	0.478 ± 0.221	0.484 ± 0.180	0.006 (-0.082-0.069)	0.862
CYP 3A4	N/A	1.992 ± 0.419	1.898 ± 0.480	0.094 (-0.183-0.372)	0.482

Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type

(IC_{95%}) : Intervalle de confiance à 95%

N/A : Ne s'applique pas

Le ratio métabolique de l'oméprazole n'est pas différent, que l'oméprazole soit administré seul ou en cocktail. De même, les résultats des autres marqueurs sont similaires avec ou sans oméprazole.

L'oméprazole ne semble donc pas influencer les autres sondes et vice-versa. L'analyse statistique avec un test de t-pairé indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes des ratios métaboliques calculées pour chaque sonde (P>0.05).

Sujets avec maladie du foie

La description des patients est résumée dans les tableaux VI et VII.

Tableau VI : Description et données de laboratoire des patients cirrhotiques (n=79)

	Nombre de patients/ Moyenne \pm écart-type
Cirrhose alcoolique	19
Cirrhose C	26
Cirrhose d'autre étiologie	34
Fumeurs	12
Prise d'alcool depuis 1 mois	12
Créatinine sérique ($\mu\text{mol/L}$)	87 ± 35
Albumine (g/L)	28 ± 7
Bilirubine ($\mu\text{mol/L}$)	50.6 ± 49.7
RNI	1.5 ± 0.4
Leucocytes ($\times 10^9 /\text{L}$)	5.0 ± 2.4
Hémoglobine (g/L)	113 ± 27
Plaquettes ($\times 10^9/\text{L}$)	119 ± 72

Tableau VII : Description et données de laboratoire des patients post-greffe (n=26)

	Nombre de patients/ Moyenne \pm écart-type
Fumeurs	6
Prise d'alcool depuis 1 mois	5
Créatinine sérique ($\mu\text{mol/L}$)	112 \pm 56
Albumine (g/L)	36 \pm 5
Bilirubine ($\mu\text{mol/L}$)	20.9 \pm 8.3
RNI	1.1 \pm 0.3
Leucocytes ($\times 10^9 /\text{L}$)	4.9 \pm 1.3
Hémoglobine (g/L)	134 \pm 14
Plaquettes ($\times 10^9/\text{L}$)	125 \pm 55

A l'exception d'un patient qui a eu une réaction allergique à l'érythromycine le lendemain du test, aucun effet secondaire n'a été observé pendant l'étude.

Aucune interférence chromatographique n'a été observée lors du dosage des échantillons des patients. Sur les 105 patients étudiés, 10 ont été exclus de l'analyse des résultats : 8 n'avaient pas absorbé l'oméprazole (Losec) et 2 n'avaient pas eu de prélèvements au temps 4 heures. Il faut toutefois noter que 15 patients avaient de petites quantités d'oméprazole et/ou d'un de ses métabolites au temps 0. Cela s'expliquait en partie par le fait que 9 de ces patients prenaient de l'oméprazole dans leur médication. Ces 15 patients n'ont pas été exclus de l'analyse.

Comme pour les témoins sains, les ratios métaboliques de l'oméprazole présentés sont ceux obtenus au temps des concentrations maximales. En effet, sur un total de 95 prises

d'oméprazole, 21 ont donné des concentrations plus élevées à 4 heures qu'à 2 heures. De plus, sur ces 21 prises, 10 étaient sous la limite de détection pour l'oméprazole au temps 2 heures. Pour les mêmes raisons que celles citées plus haut, nous avons utilisé les ratios métaboliques obtenus au temps des concentrations maximales.

Les sujets ont d'abord été séparés en deux groupes selon leur maladie : les patients post-TOF et ceux avec cirrhose. Les patients atteints de cirrhoses ont ensuite été subdivisés selon la sévérité de leur maladie à l'aide de leur score Pugh. Ils ont aussi été subdivisés selon l'étiologie de leur maladie (cirrhose C, alcoolique, et autre étiologie). Les sujets post-TOF ont également été subdivisés selon leur score Pugh. Pour tous ces groupes de patients, les valeurs des ratios métaboliques obtenus avec l'oméprazole (OH-OPZ/OPZ) ont été portés graphiquement et comparées avec celles des témoins sains (moyenne \pm écart-type), obtenues lors de la visite 3 où ils ont reçu les quatre médicaments.

Les ratios métaboliques de la CXZ et la caféine ainsi que l'EBT ont également été portés graphiquement pour les patients atteints de cirrhoses et séparés selon leur score Pugh puis pour les patients séparés en groupes selon leur maladie. Il est à noter que 2 patients post-TOF ont été exclus de l'analyse pour la CXZ parce qu'ils avaient des ratios métaboliques anormalement élevées pour cette sonde. En effet, ces patients avaient de l'insuffisance rénale et le métabolite de la chlorzoxazone est principalement éliminé par le rein, ce qui fausse les résultats.

Oméprazole

Les ratios métaboliques de l'oméprazole selon les groupes de patients sont présentés à la figure 5. Dans l'ensemble, on observe que les ratios des patients post-TOF sont semblables à ceux des témoins à l'exception d'un petit groupe de patients dont les ratios obtenus sont très faibles (autour de 0.1). Les ratios des témoins varient de 0.11 à 1.9 vs de 0.06 à 1.13 et de 0.02 à 0.34 pour les patients greffés et ceux avec cirrhoses respectivement. Comparés aux témoins, les patients avec cirrhoses ont des ratios très faibles et pour la plupart inférieurs à 0.11. La moyenne (moyenne \pm écart-type) des ratios selon les groupes est de 0.74 ± 0.55 ; 0.36 ± 0.31 et 0.10 ± 0.07 pour les témoins, les patients post-TOF et les patients avec cirrhose respectivement.

Les ratios métaboliques de l'oméprazole chez les patients avec cirrhoses et catégorisés selon la sévérité de leur maladie (Pugh) sont présentés à la figure 6. On observe que quelque soit leur score de Pugh, les patients ont des ratios métaboliques très faibles (<0.4). Les 3 sous-groupes de patients ont des ratios métaboliques semblables mais de loin inférieurs à ceux des témoins. Les ratios de chaque groupe varient de 0.11 à 1.9 vs de 0.03 à 0.26; de 0.02 à 0.34 et de 0.04 à 0.28 pour les témoins, les patients avec Pugh 5-6, 7-9 et 10-15 respectivement. La moyenne des ratios de chaque groupe est de 0.74 ± 0.55 ; 0.10 ± 0.07 ; 0.10 ± 0.08 et 0.09 ± 0.06 pour les mêmes groupes respectivement.

L'analyse de variance s'est révélée extrêmement significative ($F= 30.51$ et $P < 0.0001$) et indique qu'il existe des différences entre les groupes étudiés. Le test Tukey-Kramer indique que la différence entre les patients avec Pugh 5-6 et ceux avec Pugh 7-9 et 10-15 n'est pas significative ($P > 0.05$). Il en est de même entre les patients avec Pugh 7-9

et ceux avec Pugh 10-15 ($P > 0.05$). En revanche, la différence entre les témoins et les trois groupes de patients est extrêmement significative ($P < 0.001$)

Figure 5 : Ratios métaboliques de l'oméprazole chez les différents groupes de sujets étudiés.

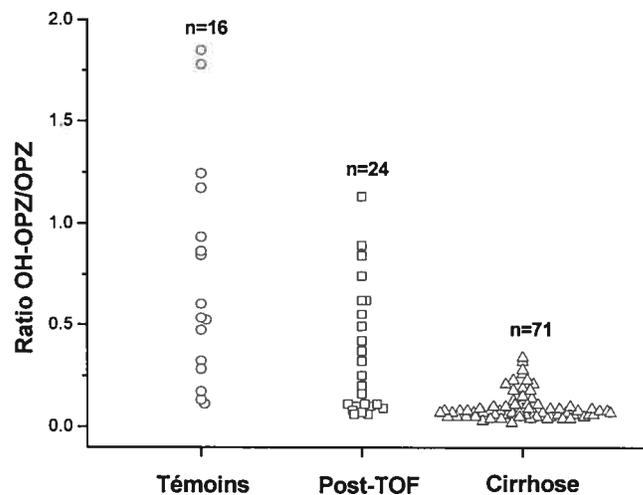
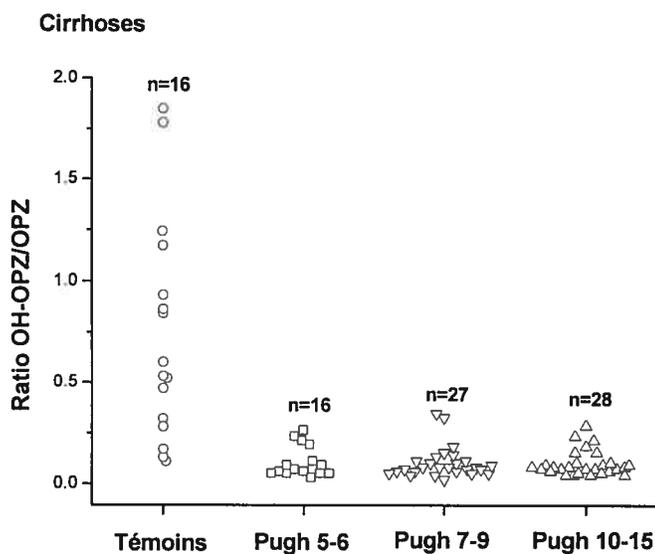
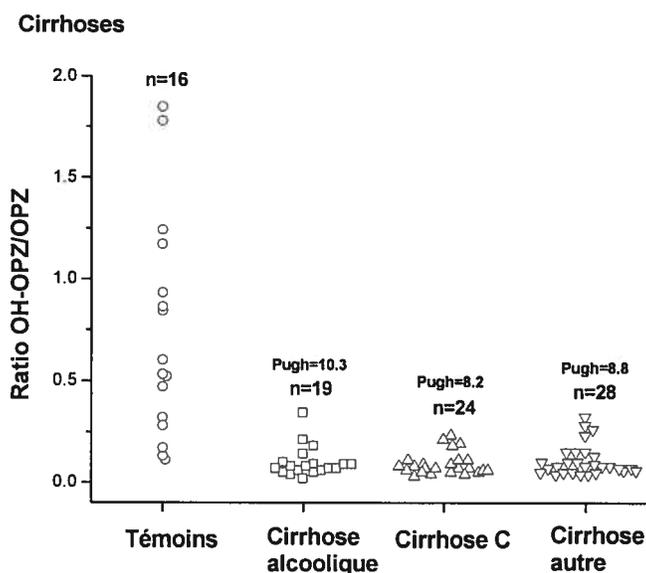


Figure 6 : Ratios métaboliques de l'oméprazole en fonction du score Pugh chez les patients cirrhotiques (n=71)



Les ratios métaboliques de l'oméprazole chez les patients cirrhotiques catégorisés selon l'étiologie de leur maladie sont présentés à la figure 7. Les valeurs des ratios sont semblables pour les trois groupes. Les ratios des patients sont pour la plupart inférieurs ou égaux à la plus basse valeur des témoins sains. Ces ratios varient de 0.11 à 1.9 vs de 0.02 à 0.34, de 0.03 à 0.23 et de 0.04 à 0.32 pour les témoins, les patients avec cirrhose alcoolique, cirrhose C et d'étiologie autre, respectivement. La moyenne des ratios pour ces mêmes groupes est respectivement de 0.74 ± 0.55 ; 0.09 ± 0.07 ; 0.09 ± 0.06 et 0.10 ± 0.08 . L'analyse de variance s'est révélée extrêmement significative ($F= 30.55$ et $P < 0.0001$) et indique par conséquent qu'il existe des différences entre les groupes étudiés. Le test Tukey-Kramer indique que la différence entre les témoins et les 3 groupes de patients est extrêmement significative ($P < 0.001$). En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les trois groupes de patients ($P > 0.05$).

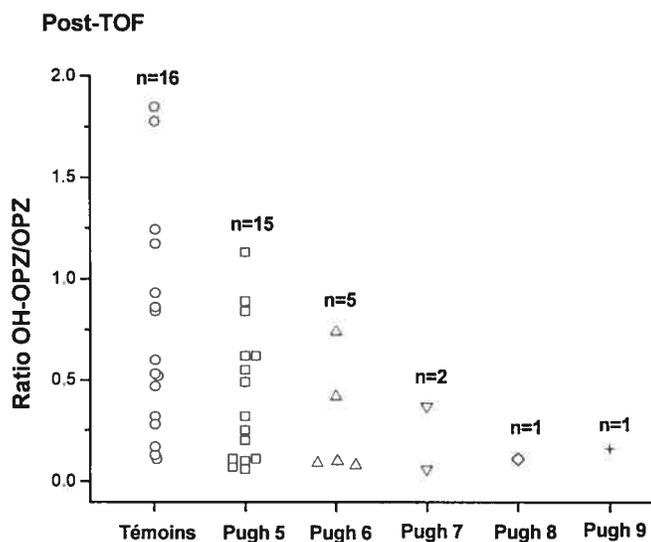
Figure 7 : Ratios métaboliques de l'oméprazole en fonction de l'étiologie de la maladie chez les patients cirrhotiques (n=71)



Les ratios métaboliques de l'oméprazole chez les patients post-TOF et séparés selon leur Pugh sont présentés à la figure 8. D'une façon générale, on observe que plus le Pugh augmente, plus les valeurs des ratios diminuent. Les ratios des patients ayant un Pugh de 5 sont semblables à ceux des témoins sains. Les ratios de chaque groupe varient de 0.11 à 1.9 vs de 0.06 à 1.13, de 0.08 à 0.74, de 0.06 à 0.37 pour les témoins, les patients avec Pugh 5, 6 et 7.

La moyenne de chaque groupe est de 0.74 ± 0.55 ; 0.42 ± 0.34 ; 0.29 ± 0.29 et 0.22 ± 0.22 . Aucune analyse de variance n'a pu être effectuée, étant donné la taille d'échantillon de certains groupes.

Figure 8 : Ratios métaboliques de l'oméprazole en fonction du score Pugh maladie chez les patients post-greffés du foie (n=24)

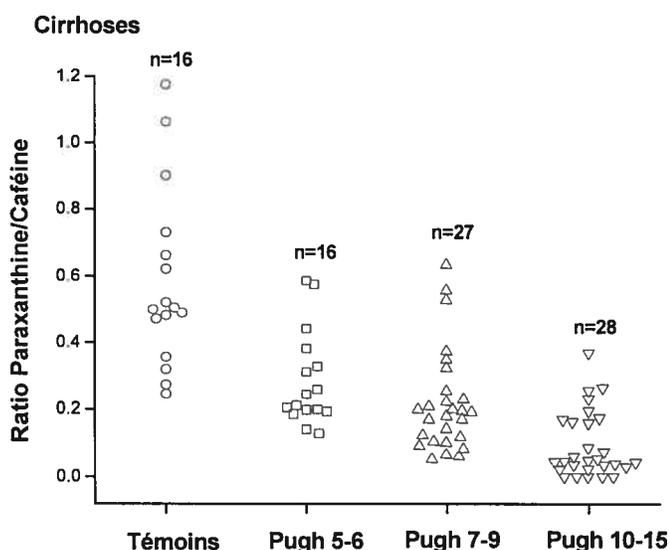


Caféine, chlorzoxazone et érythromycine

Les ratios métaboliques de la caféine chez les patients avec cirrhoses et séparés selon leur score Pugh sont présentés à la figure 9. Les valeurs de chaque groupe sont plus basses (pratiquement de moitié) que celles des témoins sains. En effet, les ratios des témoins varient de 0.25 à 1.2 alors que ceux des patients avec Pugh 5-6, 7-9 et 10-15 varient de 0.13 à 0.59 ; de 0.05 à 0.63 et de 0 à 0.37 respectivement.

La moyenne de chaque groupe est de 0.58 ± 0.27 ; 0.29 ± 0.14 ; 0.22 ± 0.15 et 0.09 ± 0.10 pour les témoins et les patients (tels que cités plus haut) respectivement. L'analyse de variance est extrêmement significative ($F= 30.56$ et $P < 0.0001$). Le test Tukey-Kramer indique que la différence entre les témoins et les trois groupes de patients est très significative ($P < 0.001$). Aussi, la différence entre les patients de Pugh 5-6 vs ceux de Pugh 10-15 est significative ($P < 0.01$). De même, la différence entre les patients de Pugh 7-9 vs ceux de Pugh 10-15 est significative ($P < 0.05$). En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les patients de Pugh 5-6 et ceux de Pugh 7-9 ($P > 0.05$).

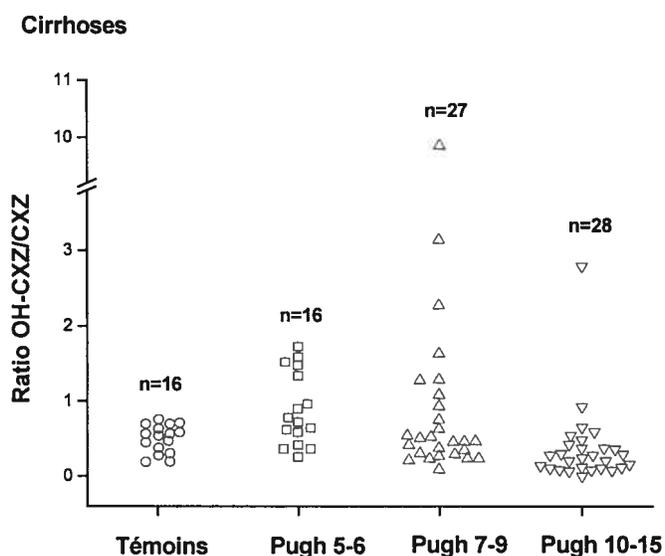
Figure 9 : Ratios métaboliques de la caféine en fonction du score Pugh chez les patients cirrhotiques (n =71)



Les ratios métaboliques de la chlorzoxazone chez les patients cirrhotiques sont présentés à la figure 10. Les valeurs des ratios des trois groupes de patients sont plus élevées que celles des témoins.

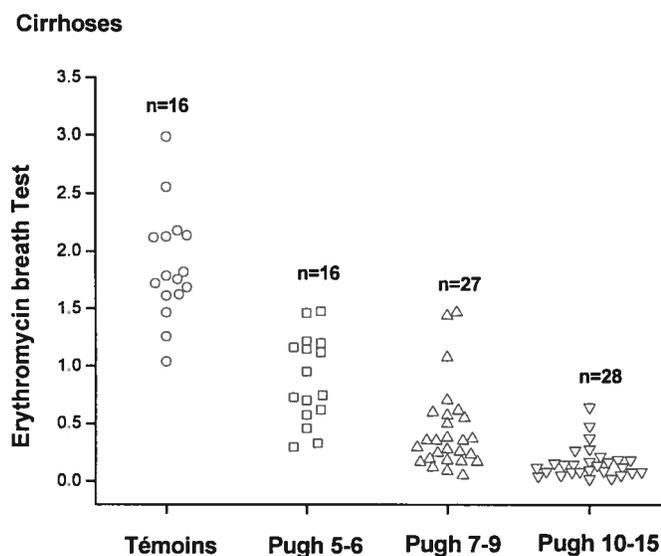
En effet, les ratios des témoins varient de 0.19 à 0.74 alors que ceux des patients avec Pugh 5-6, 7-9 et 10-15 varient respectivement de 0.25 à 1.71; de 0.08 à 9.9 et de 0 à 2.8. La moyenne de chaque groupe est de 0.49 ± 0.18 ; 0.88 ± 0.49 ; 1.07 ± 1.89 et 0.37 ± 0.52 pour les témoins, les patients avec Pugh 5-6, 7-9 et 10-15 respectivement. Cependant, l'analyse de variance démontre que ces différences ne sont pas significatives ($F = 2.10$ et $P = 0.1068$).

Figure 10 : Ratios métaboliques de la chlorzoxazone en fonction du score Pugh chez les patients cirrhotiques (n=71)



Les résultats obtenus lors du test d'exhalaison à l'érythromycine (EBT) chez les patients cirrhotiques sont présentés à la figure 11. Les résultats de l'EBT sont exprimés en pourcentage (%) de la dose administrée et expirée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ en une heure. On constate que les valeurs des témoins sont beaucoup plus élevées que celles des patients des trois groupes. La moyenne de chaque groupe est de 1.87 ± 0.48 ; 0.89 ± 0.38 ; 0.44 ± 0.37 et 0.17 ± 0.14 pour les témoins et les patients respectivement. L'analyse de variance est très significative ($F = 92.46$ et $P < 0.0001$). Il existe donc une différence entre les groupes étudiés. Le test Tukey-Kramer indique que la différence entre tous les groupes étudiés est significative ($P < 0.05$).

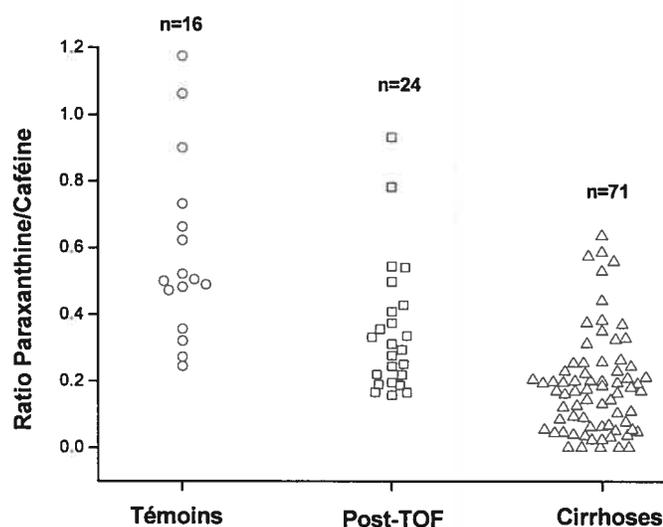
Figure 11 : Test respiratoire à l'érythromycine en fonction du score Pugh chez les patients cirrhotiques (n=71)



Les ratios métaboliques de la caféine chez les patients séparés en groupes selon leur maladie sont présentés à la figure 12.

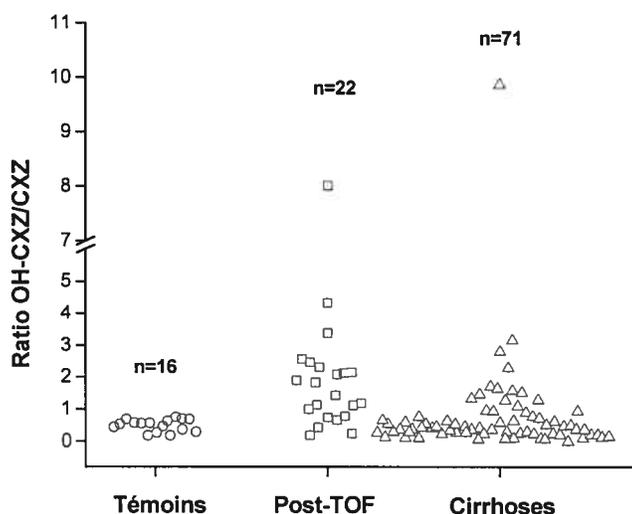
Dans l'ensemble, on observe que certains patients des 2 groupes ont des ratios semblables à ceux des témoins. Toutefois, il y a une plus grande proportion de patients cirrhotiques que de patients post-greffe ayant des ratios inférieurs ou égaux à la plus basse valeur des témoins. Les ratios varient de 0.25 à 1.2 vs de 0.16 à 0.93 et de 0 à 0.63 pour les témoins, les patients post-greffe et cirrhotiques respectivement. La moyenne de chaque groupe est de 0.58 ± 0.27 ; 0.35 ± 0.20 et 0.19 ± 0.15 pour les groupes (tels que cités plus haut) respectivement. L'analyse de variance est extrêmement significative ($F=33.72$ et $P < 0.001$). Le test Tukey-Kramer indique que la différence entre les témoins et les 2 groupes de patients est significative ($P < 0.001$). Il en est de même entre les patients post-greffe et les cirrhotiques ($P < 0.001$).

Figure 12 : Ratios métaboliques de la caféine chez les différents groupes de sujets étudiés.



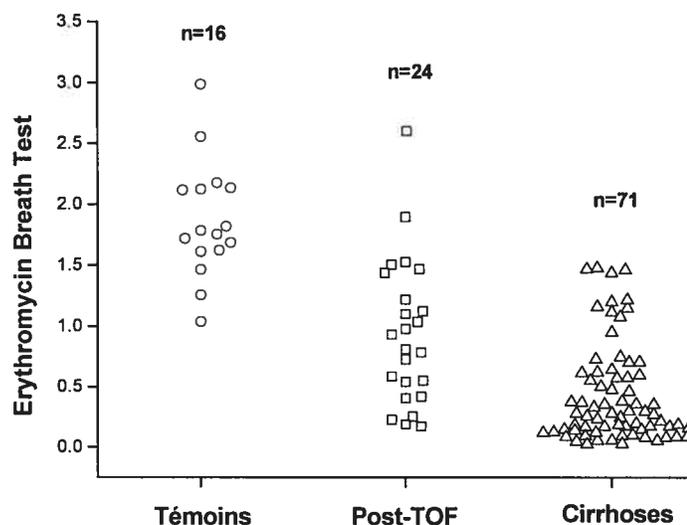
Les ratios métaboliques de la chlorzoxazone chez les patients séparés en groupes selon leur maladie sont présentés à la figure 13. La plupart des patients cirrhotiques ainsi que certains patients post-greffe ont des valeurs de ratios semblables à celles des témoins. En revanche, la plupart des patients post-greffe ont des valeurs de ratios plus élevées que celles des témoins et des patients cirrhotiques (à l'exception de quelques patients cirrhotiques qui ont des valeurs de ratios semblables à ceux des post-greffe). Les ratios varient de 0.19 à 0.74 vs de 0.21 à 8.02 et de 0 à 9.9 pour les témoins, les patients post-greffe et cirrhotiques respectivement. La moyenne de chaque groupe est de 0.49 ± 0.18 ; 1.92 ± 1.70 et 0.75 ± 1.25 pour les groupes (tels que cités plus haut) respectivement. L'analyse de variance est significative ($F=13.77$ et $P < 0.001$). Le test Tukey-Kramer indique que la différence entre les patients post-greffe et les 2 autres groupes est significative ($P < 0.001$). En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les témoins et les patients cirrhotiques ($P > 0.05$).

Figure 13 : Ratios métaboliques de la chlorzoxazone chez les différents groupes de sujets étudiés.



Les résultats obtenus lors du test d'exhalaison à l'érythromycine (EBT) chez les différents groupes de sujets sont présentés à la figure 14. Les résultats de l'EBT sont exprimés en pourcentage (%) de la dose administrée et expirée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ en une heure comme à la figure 11. On constate que les témoins ont des valeurs beaucoup plus élevées que celles des 2 groupes de patients. Toutefois, environ la moitié des patients post-TOF ont des valeurs semblables aux témoins, alors que l'autre moitié a des valeurs beaucoup plus basses et semblables à celles de la plupart des cirrhotiques. La moyenne de chaque groupe est 1.87 ± 0.48 ; 0.94 ± 0.60 et 0.43 ± 0.41 pour les témoins, les patients post-TOF et les cirrhotiques respectivement. L'analyse de variance est très significative ($F=65.42$ et $P < 0.001$). Le test Tukey-Kramer indique que la différence entre tous les groupes étudiés est significative ($P < 0.001$).

Figure 14 : Test respiratoire à l'érythromycine chez les différents groupes de sujets étudiés.



Corrélations de l'Oméprazole

Les corrélations entre l'oméprazole et les autres sondes du CYP450 chez les groupes étudiés (témoins, cirrhoses et post-TOF) ont été évaluées par analyse de régression linéaire pour les données paramétriques.

Les résultats ainsi que les données statistiques sont présentés dans les figures 15 à 20. Pour la chlorzoxazone, deux patients post-TOF ont été exclus de l'analyse pour les raisons évoquées plus haut.

Témoins

Chez les témoins (figures 15 à 17), aucune corrélation n'a été observée entre le CYP 2C19 (oméprazole) et les CYP2E1 ($r=0.08$ et $P=0.76$) et 1A2 ($r=0.30$ et $P=0.26$). Il y a toutefois une corrélation négative marginale entre le 2C19 et le 3A4 ($r=-0.55$ et $P=0.03$).

Figure 15 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP1A2 chez les témoins

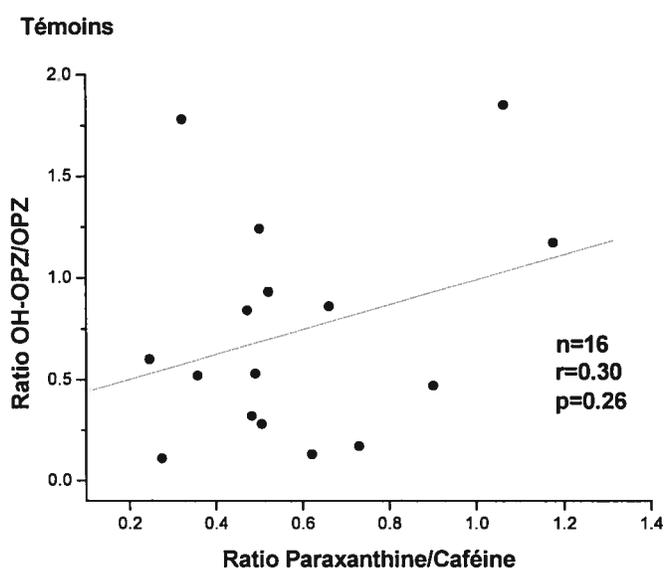


Figure 16 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP3A4 chez les témoins

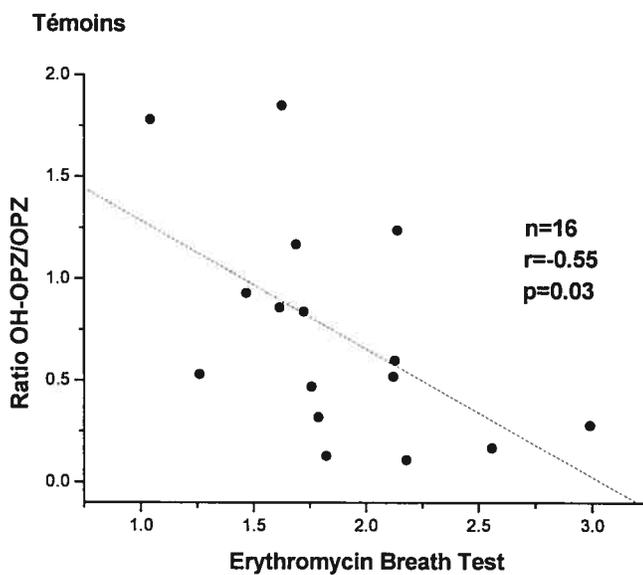
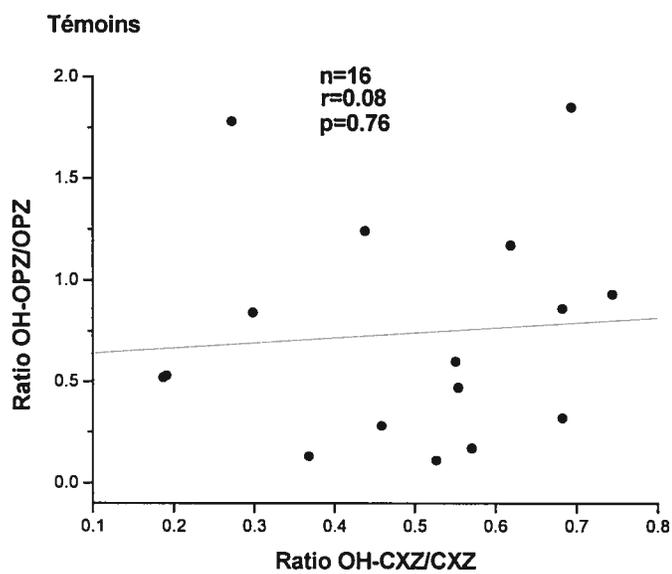


Figure 17 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP2E1 chez les témoins



Patients avec cirrhose et post-greffe

Chez les patients avec cirrhose (figures 18 à 20), il n'y a également pas de corrélation entre le CYP2C19 et les CYP3A4 ($r = 0.05$ et $P=0.68$), 1A2 ($r = 0.12$ et $P = 0.34$) et 2E1 ($r = -0.10$ et $P = 0.43$).

Chez les patients post-TOF (figures 21 à 23), il n'y a aucune corrélation entre le CYP2C19 et le 2E1 ($r = -0.21$ et $P=0.34$). Toutefois, il y a une assez bonne corrélation positive entre le CYP2C19 et le 1A2 ($r = 0.64$ et $P < 0.001$) et entre le 2C19 et le 3A4 ($r = 0.64$ et $P < 0.001$).

Figure 18 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP2E1 chez les patients cirrhotiques

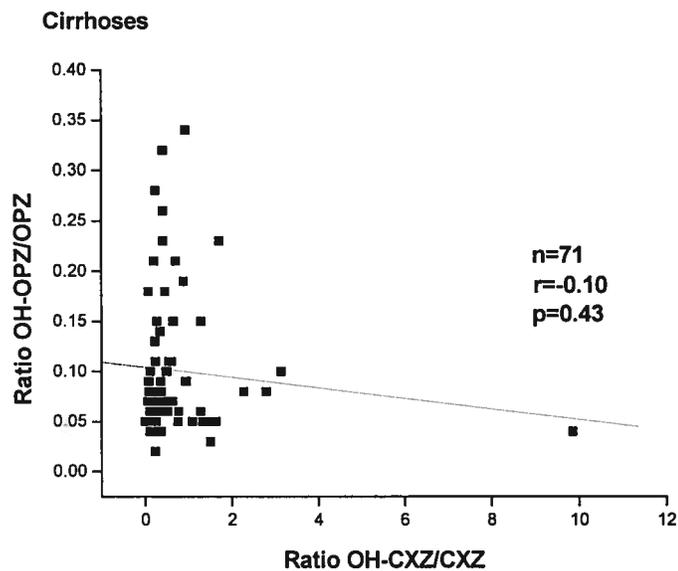


Figure 19 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP3A4 chez les patients cirrhotiques

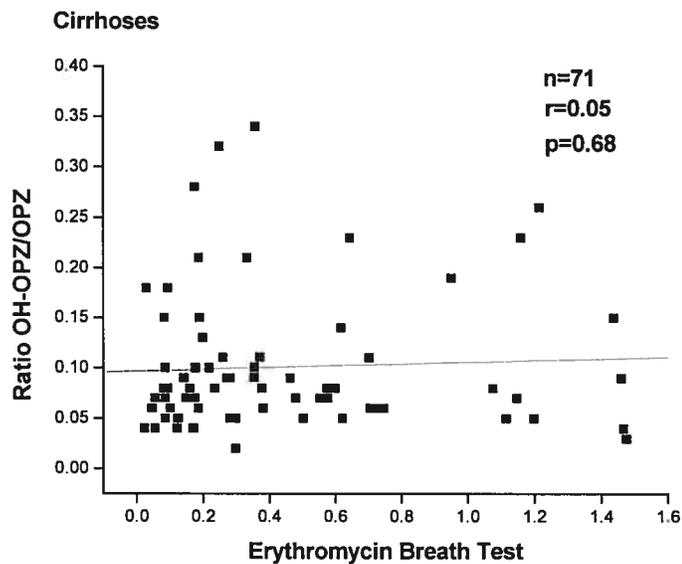


Figure 20 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP1A2 chez les patients cirrhotiques

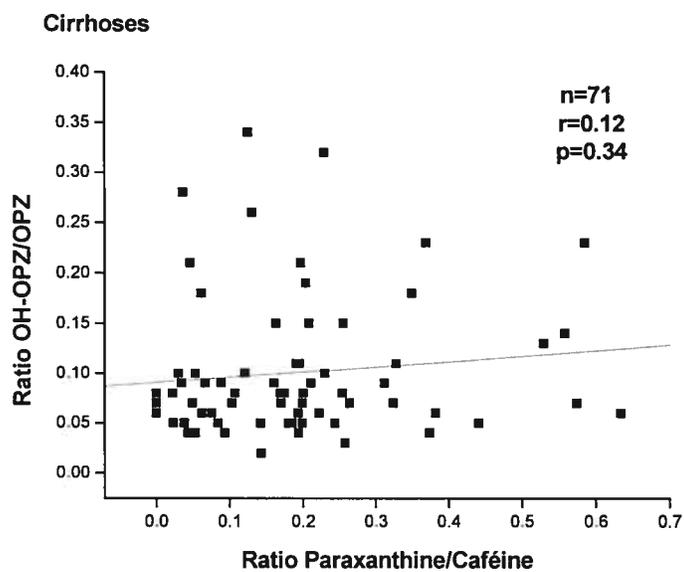


Figure 21 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP1A2 chez les patients post-greffe du foie

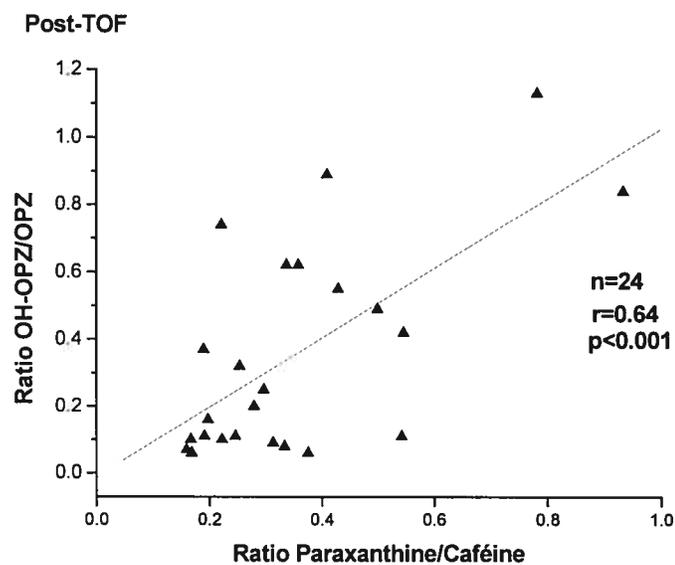


Figure 22 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP2E1 chez les patients post-greffe du foie

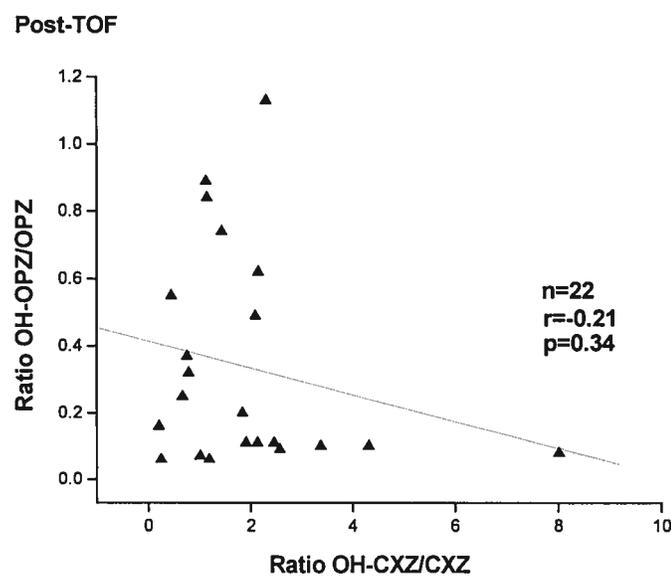
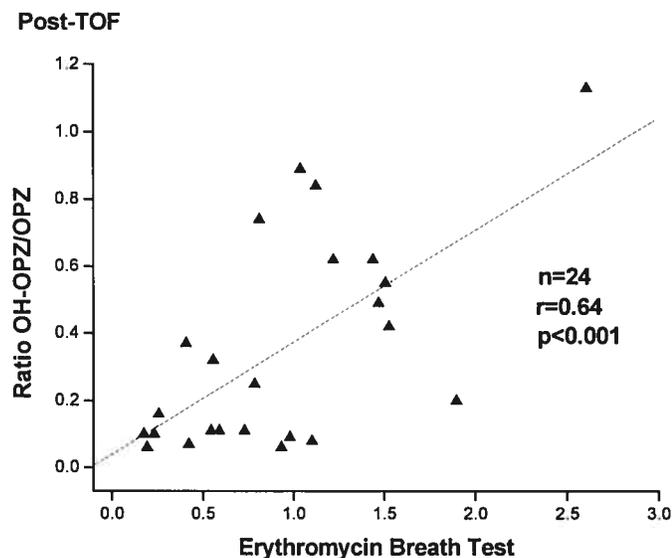


Figure 23 : Courbe de corrélation des activités du CYP2C19 et du CYP3A4 chez les patients post-greffe du foie



Corrélations des autres sondes

Les corrélations entre les autres sondes du P450 chez ces mêmes groupes, ont aussi été évaluées de la même manière. Les résultats et les données statistiques sont présentés aux figures 24 à 32. Chez les témoins (figures 24 à 26), il n'y a aucune corrélation entre les CYP1A2 et 3A4 ($r = -0.11$ et $P = 0.69$), entre les CYP2E1 et 3A4 ($r = 0.08$ et $P = 0.76$) puis entre les CYP 1A2 et 2E1 ($r = 0.45$ et $P = 0.08$). Chez les patients avec cirrhose (figures 27 à 29), il n'y a pas de corrélation entre les CYP 1A2 et 2E1 ($r = 0.27$ et $P = 0.03$). En revanche, il y a une faible corrélation entre les CYP 1A2 et 3A4 ($r = 0.50$ et $P < 0.0001$) puis entre les CYP 2E1 et 3A4 ($r = 0.47$ et $P < 0.0001$). Chez les patients post-TOF (figure 30 à 32), il n'y a pas de corrélation entre les CYP 1A2 et 2E1 ($r = -0.28$ et $P = 0.20$) puis entre les CYP 2E1 et 3A4 ($r = -0.20$ et $P = 0.37$). Par contre, il y a une assez bonne corrélation entre le CYP 1A2 et le 3A4 ($r = 0.64$ et $P < 0.001$).

Témoins

Figure 24 : Courbe de corrélation des activités du CYP1A2 et du CYP2E1 chez les témoins

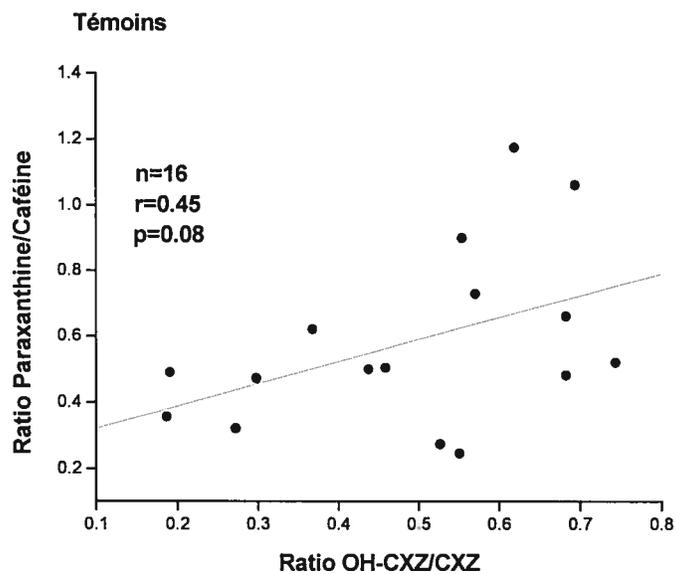


Figure 25 : Courbe de corrélation des activités du CYP2E1 et du CYP3A4 chez les témoins

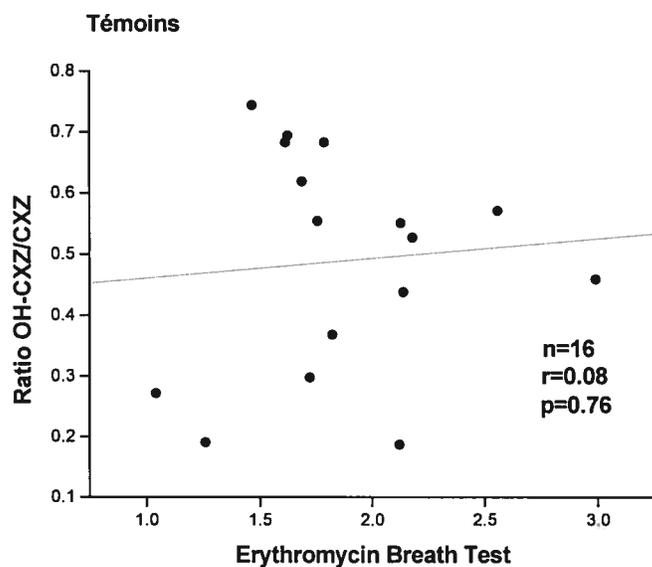
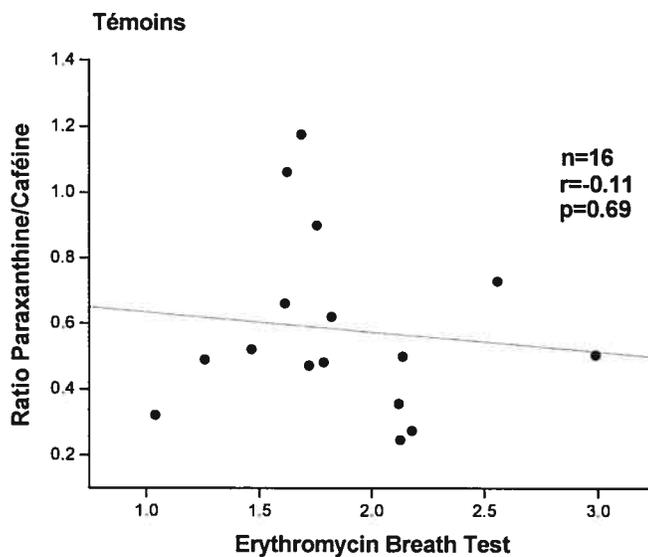


Figure 26 : Courbe de corrélation des activités du CYP1A2 et du CYP3A4 chez les témoins



Patients avec cirrhose

Figure 27 : Courbe de corrélation des activités du CYP2E1 et du CYP3A4 chez les patients cirrhotiques

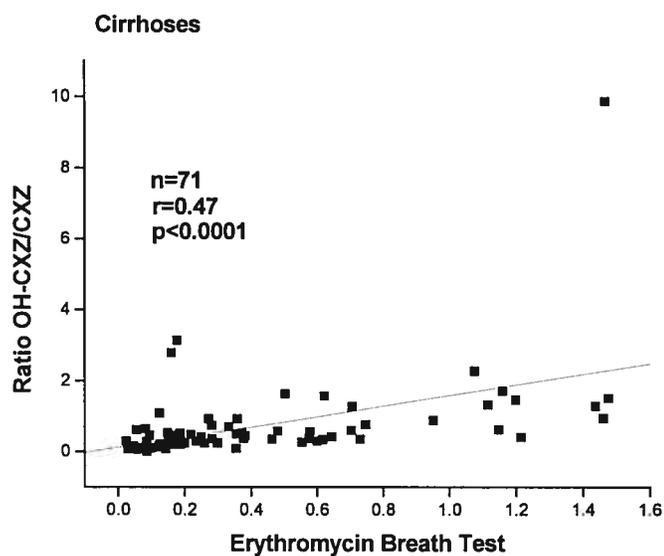


Figure 28 : Courbe de corrélation des activités du CYP1A2 et du CYP3A4 chez les patients cirrhotiques

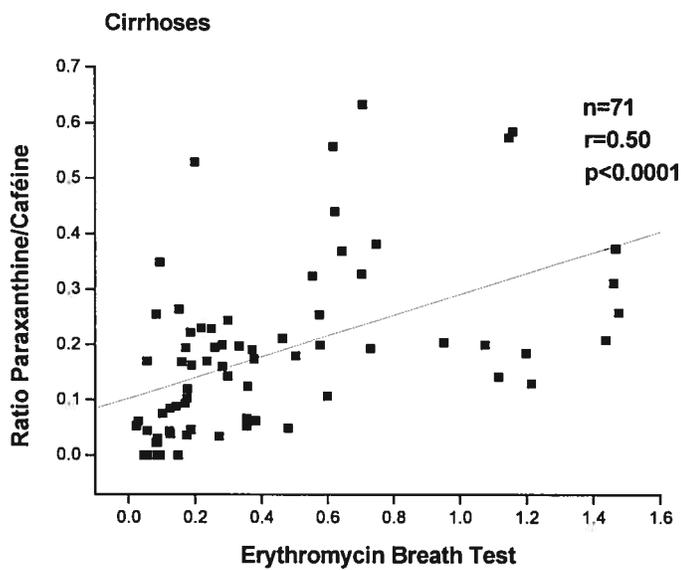
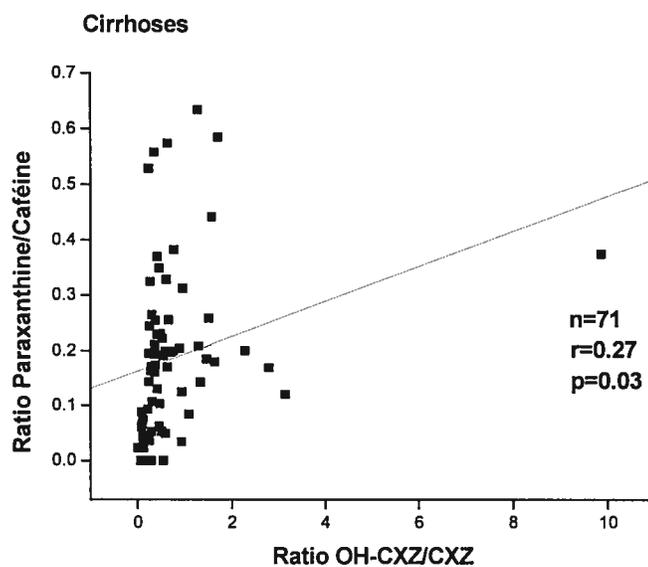


Figure 29 : Courbe de corrélation des activités du CYP1A2 et du CYP2E1 chez les patients cirrhotiques



Patients post-greffe

Figure 30 : Courbe de corrélation des activités du CYP1A2 et du CYP3A4 chez les patients post-greffe du foie

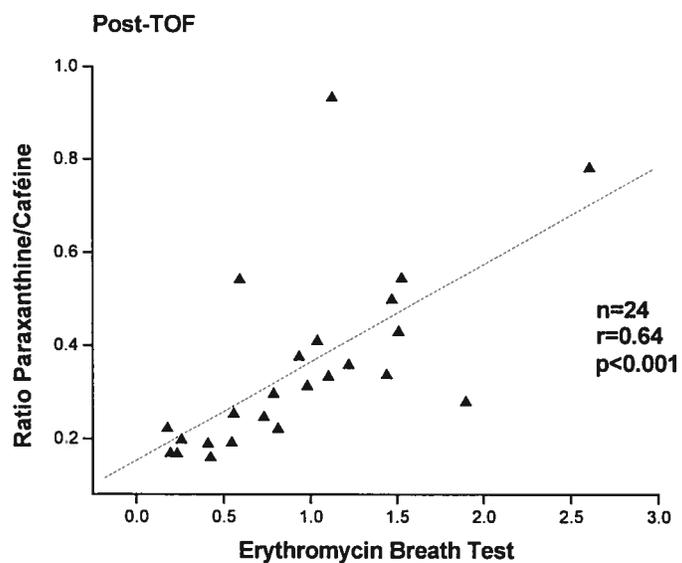


Figure 31 : Courbe de corrélation des activités du CYP1A2 et du CYP2E1 chez les patients post-greffe du foie

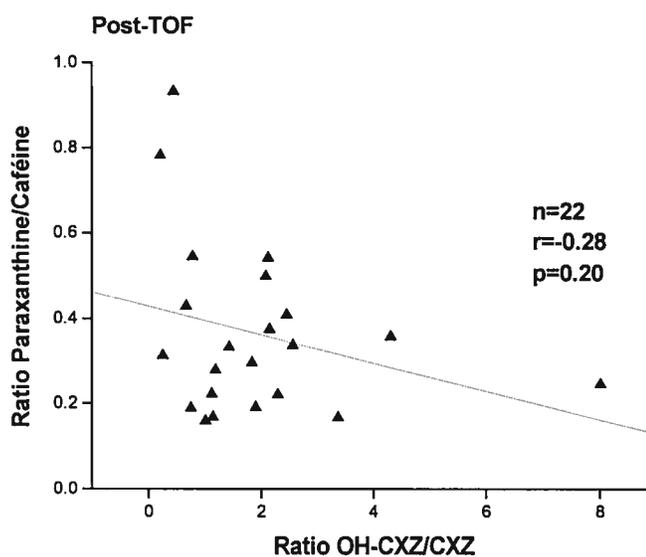
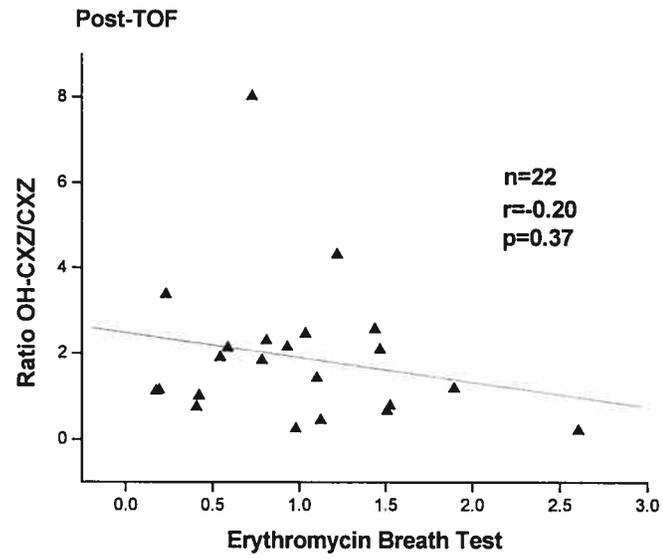


Figure 32 : Courbe de corrélation des activités du CYP2E1 et du CYP3A4 chez les patients post-greffe du foie



QUATRIÈME PARTIE

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION

A- ÉTUDE CHEZ LES SUJETS SAINS

Dans cette étude, les marqueurs utilisés pour phénotyper l'activité des différentes isoenzymes du CYP450 à l'étude semblent fiables.

En effet, la caféine est la sonde la plus utilisée pour phénotyper le CYP1A2. (Zaigler et coll., 2000; Spigset et coll., 1999) De plus, elle est sécuritaire et offre de nombreux avantages pour le phénotypage de cette isoenzyme (Streetman et coll., 2000).

Aussi, la chlorzoxazone reste la seule sonde valable pour phénotyper le CYP2E1 et est utilisée depuis longtemps (Kivisto et Kroemer, 1997). Il a été suggéré que les isoenzymes CYP1A2, 1A1 et 3A4 sont impliquées dans l'hydroxylation de cette molécule (Carrière et coll., 1993; Gorski et coll., 1997; Jayyosi et coll., 1995). Toutefois, ces hypothèses ont été revues par une étude de Lucas et coll. (1999) qui concluent que la principale enzyme responsable du métabolisme (hydroxylation) de la chlorzoxazone est le CYP2E1 et que le CYP3A4 constitue la seule voie mineure. Pour le phénotypage du CYP3A4, la sélection d'une sonde idéale fait l'objet de controverses. Cependant, l'EBT apparaît comme la méthode la plus fiable (Streetman et coll., 2000; Kivisto et coll., 1997).

L'oméprazole a remplacé la méphénytoïne comme standard pour phénotyper le CYP2C19, à cause des problèmes de sécurité et stabilité que posait cette substance. Son métabolite principal, le 5-hydroxyoméprazole est produit spécifiquement par cette isoenzyme (Kovacs et coll., 1999; Wedlund, 2000; Flockhart, 1995).

Des études ont démontré une très bonne corrélation entre les résultats obtenus avec l'oméprazole et ceux obtenus avec la méphénytoïne pour phénotyper le CYP2C19 (Chang et coll., 1995; Balian et coll., 1995). L'oméprazole est donc un marqueur validé du CYP2C19.

Plusieurs cocktails de phénotypage ont déjà été validés à ce jour et ce, chez un nombre semblable de sujets (Streetman et coll., 2000; Zhu et coll., 2001). Le cocktail métabolique comprenant la caféine, l'érythromycine et la chlorzoxazone est valide et fréquemment utilisé à l'hôpital Saint-Luc du CHUM.

Nous devons donc déterminer si l'ajout de l'oméprazole à ce cocktail, permet de phénotyper simultanément et correctement les CYP450 1A2, 2C19, 3A4 et 2E1.

Nous avons constaté d'une part que les résultats de l'oméprazole administré seul ou en cocktail semblent constants (figure 1). D'un autre côté, les autres marqueurs ne semblent pas influencés par l'oméprazole (figure 2 à 4). Il n'y a en effet, pas de différence statistiquement significative entre les moyennes des ratios métaboliques obtenus lors de chaque visite, pour les quatre sondes. Nous pouvons donc en déduire que l'oméprazole est sans effet sur le cocktail des trois autres sondes et vice-versa.

Nous avons cependant observé une grande variation des ratios métaboliques obtenus avec l'oméprazole. Cela est possiblement dû au polymorphisme génétique auquel est sujet le CYP2C19. Le phénotype de métaboliseur lent, rapide ou intermédiaire pourrait expliquer en effet les variations observées.

Lors de cette étude, nous avons observé que presque tous les sujets ayant des concentrations maximales d'oméprazole et de son métabolite principal au temps 4 heures, avaient des taux indétectables de ces mêmes substances au temps 2 heures.

Des résultats similaires ont déjà été observés par Marinac et coll. (1996) qui ont obtenu chez 30 des 100 sujets étudiés, des concentrations d'oméprazole sous la limite de détection, au temps 2 heures.

Parmi les 30 sujets, 23 avaient également des taux indétectables du métabolite principal (5-OH-OPZ). Il semble donc qu'il y ait un délai dans l'absorption de l'oméprazole. Cependant, cette absorption s'est avérée imprévisible d'un sujet à l'autre et d'une visite à l'autre. En effet, le temps d'obtention des concentrations maximales varie entre les sujets, et d'une visite à l'autre pour un même sujet. Nous n'avons cependant pu trouver aucun lien avec la séquence d'administration des médicaments, la prise d'oméprazole seule ou en cocktail ou tout autre facteur. Cette absorption erratique de l'oméprazole est probablement due à la formulation d'oméprazole utilisée dans cette étude. Il existe en effet plusieurs formulations pharmaceutiques d'oméprazole dont les comprimés à dissolution entérique et les capsules de granule. Il est donc possible qu'une désintégration et une dissolution non uniforme de la formulation utilisée puissent entraîner des variations de l'absorption de l'oméprazole. Le temps d'échantillonnage optimal pour phénotyper le CYP2C19 semble donc difficile à déterminer. Par conséquent, l'utilisation du temps d'obtention des concentrations maximales, plutôt que celle d'un temps précis apparaît être un bon compromis. Nous pensons donc que nos résultats sont valides.

En conclusion, l'ajout de l'oméprazole à un cocktail métabolique comprenant la caféine, l'érythromycine et la chlorzoxazone permet de phénotyper simultanément et indépendamment les 4 cytochromes P450 2C19, 1A2, 3A4 et 2E1 respectivement. La validation de ce nouveau cocktail de phénotypage chez les sujets sains, nous a

permis d'étudier l'activité enzymatique de ces cytochromes chez des patients avec cirrhoses du foie et par conséquent d'évaluer leur fonction hépatique.

B- ÉTUDE CHEZ LES PATIENTS AVEC MALADIE DU FOIE

L'activité du CYP450 2C19 et celle des CYP450 1A2, 3A4 et 2E1 a été étudiée chez les patients avec maladie du foie. Nous avons tout d'abord comparé l'activité du CYP2C19 chez les différents groupes de sujets étudiés (figure 5). Nos résultats montrent que comparée aux témoins, l'activité de cette isoenzyme est dans l'ensemble diminuée chez les patients post-greffés du foie et très diminuée chez les patients avec cirrhose du foie. Toutefois, l'activité du CYP2C19 est assez semblable à celle des sujets sains chez un bon nombre de patients post-greffés du foie. Comme l'activité de cette isoenzyme diffère également entre les patients post-greffés du foie et ceux avec cirrhose, nous pouvons donc en conclure que la transplantation de l'organe du foie restaure l'activité du CYP2C19 à un degré dépendant de la récurrence de l'hépatite d'un patient.

Nous avons ensuite évalué l'effet de la sévérité et l'étiologie de la maladie sur l'activité du CYP2C19, chez les patients avec cirrhose du foie (figure 6 et 7).

Nous avons constaté que l'activité de cette isoenzyme demeurait très basse mais était plus ou moins semblable entre les sous-groupes de patients et ce quelque soit le degré de sévérité et l'étiologie de la maladie. Cela signifie donc qu'en présence d'une cirrhose du foie, la sévérité et l'étiologie de la maladie n'ont pas d'impact différentiel sur l'activité du CYP2C19.

Nous en concluons alors que le CYP2C19 est très sensible à la maladie et ce à un point tel que la seule présence de la maladie suffit à réduire considérablement son activité.

Une des limitations de cette étude est que nous n'avons pas étudié le génotype des sujets. Le génotype CYP2C19 a en effet deux mutations majeures et la synthèse de l'enzyme CYP2C19 se fait à partir d'une paire spécifique d'allèles. Les différentes

combinaisons d'allèles sont associées au phénotype de métaboliseur rapide ou de métaboliseur lent. Les métaboliseurs lents ont une faible activité de l'enzyme alors que les métaboliseurs rapides peuvent avoir une activité de l'enzyme élevée ou intermédiaire (McColl et coll., 2002). Il n'est pas donc pas à exclure que ce polymorphisme génétique puisse expliquer en partie les résultats obtenus. Dans cette étude, la majorité des patients étaient de race blanche et le phénotype de métaboliseur lent représente 2.1% de cette population (Xie et coll., 1999). Toutefois, si les métaboliseurs lents étaient surreprésentés chez les patients avec maladie du foie, cela pourrait en effet expliquer en partie la très basse activité du CYP2C19 qui a été observée chez les patients. Il aurait donc été intéressant d'étudier le génotype des patients.

L'effet de la sévérité de la maladie sur les cytochromes P450 1A2, 3A4 et 2E1 a également été évalué chez ces mêmes patients avec cirrhose (figure 9 à 11).

Dans le cas du CYP1A2 (figure 9), nous avons observé que comparée aux témoins, l'activité de cette isoenzyme était dans l'ensemble diminuée de moitié chez tous les sous groupes de patients. De même, nous avons constaté que plus le score de Pugh augmente (et donc la sévérité de la maladie), plus l'activité de cette isoenzyme diminue. Des résultats semblables à ceux-ci ont également été observés avec le CYP3A4 (figure 11). Cela suggère que la sévérité de la maladie est un déterminant majeur de l'activité des isoenzymes CYP 1A2 et 3A4 en présence d'une maladie du foie. En revanche, avec le CYP2E1 (figure 10) nous avons obtenu des résultats différents. En effet, contrairement à ce qu'on aurait pu penser, l'activité de cette isoenzyme n'est pas diminuée chez les patients avec cirrhose du foie. Certains sujets ont même une activité du CYP2E1 plus

élevée que chez les témoins. A la lueur de tout cela, nous déduisons que l'activité de cette isoenzyme ne semble pas affectée par la maladie.

Les résultats obtenus concordent avec ceux de précédentes études. En effet, George et coll. (1995) ont démontré qu'en présence d'une maladie chronique du foie sévère, les isoenzymes du CYP450 sont sélectivement modifiées.

Certaines isoenzymes sont profondément diminuées, d'autres moins ou pas du tout. De plus, Farrell et coll. (1979) ont également montré que même en présence d'une maladie du foie sévère, certaines activités enzymatiques étaient bien préservées.

Aussi, Adedoyin et coll. (1998) ont démontré que le CYP2C19 était beaucoup plus sensible à la maladie que le CYP2D6 chez des patients avec maladie du foie légère ou modérée. En revanche, une diminution importante de l'activité du CYP2C19 chez ces mêmes patients, a été observée et reliée avec la sévérité de la maladie. Cette affirmation contredit nos observations dans le sens où l'activité du CYP2C19 ne semble pas dépendre de la sévérité de la maladie. Nous pensons que cela est dû au petit nombre de patients utilisés dans l'étude d'Adedoyin et coll.(1998). En effet, ils ont étudiés 18 patients (dont 7 dans chaque sous-groupe) versus 105 patients pour nous, pour arriver à cette conclusion. A la lueur de tout cela, nous pensons que nos résultats sont valides.

L'activité des cytochromes P450 1A2, 2E1 et 3A4 a également été comparée chez les différents groupes de sujets étudiés (figure 12 à 14).

Nous avons constaté que comparée aux témoins, l'activité du CYP1A2 (figure 12) était dans l'ensemble diminuée chez les patients post-greffe et très diminuée chez ceux avec cirrhose. Toutefois, l'activité du CYP1A2 est assez semblable à celle des témoins chez un bon nombre de patients post-greffe. En revanche, l'activité de cette isoenzyme diffère

entre les patients post-greffe et ceux avec cirrhose. Des résultats similaires à ceux-ci ont également été observés avec le CYP3A4 (figure 14). Nous en déduisons que comme pour le CYP2C19, la transplantation de l'organe du foie restaure l'activité des CYP450 1A2 et 3A4 à un degré dépendant de la récurrence de l'hépatite d'un patient. Dans le cas du CYP2E1 (figure 13), des résultats différents ont été obtenus. En effet, nous avons constaté que comparée aux témoins, l'activité de cette enzyme n'était pas diminuée chez les deux groupes de patients. Un bon nombre de patients post-greffe ont une activité de l'enzyme plus élevée que celle des 2 autres groupes, qui ont une activité assez semblable. A la lueur de tout cela, nous concluons que la maladie ne semble pas affecter l'activité du CYP2E1 d'une part, et d'autre part que la transplantation de l'organe du foie semble entraîner une augmentation de l'activité de cette isoenzyme.

Nous avons ensuite voulu déterminer s'il y avait une corrélation entre l'activité du CYP2C19 et celles des autres sondes d'une part (figures 15 à 23) puis entre les activités des autres sondes entre elles, d'autre part (figures 24 à 32) chez tous les groupes de sujets étudiés. Le mécanisme probablement le plus important de la diminution des CYP450 est la diminution de la masse hépatique. Cette dernière devrait en théorie entraîner une diminution de façon proportionnelle de toutes les isoenzymes. L'étude des corrélations devait donc nous permettre d'évaluer si tel est le cas.

Chez les sujets témoins, aucune corrélation n'a été observée entre l'activité du CYP2C19 et celle des autres isoenzymes, ni entre l'activité de ces isoenzymes entre elles. Ces observations ont du sens dans la mesure où elles suggèrent que les activités des isoenzymes du cytochrome P450 ne sont pas interdépendantes. En effet, chaque isoenzyme du CYP450 a sa propre régulation d'activité. Une certaine corrélation a été

cependant observée entre le CYP2C19 et le CYP3A4. Comme la régulation de l'activité de chaque isoenzyme est indépendante de celle des autres isoenzymes et que le contraire n'a pas été démontré, cette observation est probablement due à la présence d'un facteur confondant, ou à un effet du hasard.

Chez les patients avec cirrhose, il n'y a également pas de corrélation entre l'activité du CYP2C19 et celle des autres isoenzymes. En revanche, il y a une certaine corrélation entre les activités des autres isoenzymes entre elles, chez ces mêmes patients. Ces observations peuvent s'expliquer de deux façons. Tout d'abord, l'insuffisance hépatique entraîne chez ces patients une diminution de l'activité des isoenzymes du CYP450. Cette diminution est proportionnelle au degré d'insuffisance hépatique pour les CYP450 1A2 et 3A4. La conséquence est qu'il y a une tendance à la baisse pour toutes les isoenzymes du CYP450 : ce qui explique une certaine corrélation entre leurs activités. Dans le cas du CYP2C19, nous pensons que son activité ne corrèle pas avec celle des autres isoenzymes parce qu'il y a des facteurs autres que la diminution de la masse hépatique qui sont responsables de sa diminution. Ces facteurs pourraient être le polymorphisme génétique ou d'autres facteurs qui sont discutés plus loin.

Chez les patients post-greffés du foie, nous avons observé à l'exception du CYP2E1, une corrélation entre l'activité du CYP2C19 et celle des autres isoenzymes. De même, une corrélation a été observée entre les activités des CYP450 1A2 et 3A4. Cependant, aucune corrélation n'a été observée entre l'activité du CYP2E1 et celle des CYP 1A2 et 3A4. Les patients post-greffés du foie ont tous une récurrence de l'hépatite C mais à divers degrés. Ils ne sont pas aussi malades qu'avant la greffe, mais leur état dépend de la sévérité de la récurrence et du temps écoulé depuis la transplantation. Il n'en demeure pas

moins que certains d'entre eux ont de l'insuffisance hépatique et d'autres en ont moins. Cela signifie que comme pour les patients avec cirrhose, il y a une tendance à la diminution pour les isoenzymes : d'où la corrélation entre leurs activités. Ces déductions ne sont pas valables dans le cas du CYP2E1. Comme l'activité de cette enzyme semble augmenter chez les patients post-greffe, il apparaît en effet probable qu'après la greffe, il y ait des facteurs qui modifient son activité. Le résultat est que ces facteurs vont réguler le CYP2E1 différemment des autres isoenzymes. Ceux-ci pourraient par exemple être des interactions médicamenteuses, les médicaments que prennent ces patients, le diabète ou l'obésité.

Il reste maintenant à déterminer pourquoi le CYP2C19 est très sensible à la maladie, comparé aux autres isoenzymes. Nous savons que la maladie entraîne une diminution de la quantité d'enzyme et donc de l'activité enzymatique. Cela peut être dû à une destruction des hépatocytes ou impliquer alors une régulation négative de l'expression du gène codant pour cette enzyme, au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Au niveau transcriptionnel, la répression enzymatique peut se faire par exemple par l'activation des éléments de régulation négative ou par la diminution des éléments potentialisateurs et des facteurs nucléaires. Une diminution drastique de l'activité pourrait par exemple être due à l'effet combiné de ces 3 facteurs en même temps : ce qui amplifierait la répression enzymatique. Une autre explication pourrait aussi être la dégradation massive de l'isoforme par une molécule qui serait activée en présence de la maladie. Il est également possible que la maladie soit associée à une production de cytokines ou d'autres médiateurs sériques capables de moduler simultanément l'activité et l'expression de l'enzyme ainsi que la quantité de son ARNm. Aussi, le fait que le

CYP2C19 soit sujet à un polymorphisme génétique pourrait peut-être avoir un lien avec la sensibilité de cette isoenzyme. Une autre hypothèse pourrait être la compétition des CYP450 pour les électrons du NADPH. En effet, il a été démontré qu'il y a quatre moles de CYP450 pour une mole de NADPH cytochrome P450 réductase dans les microsomes de foie humain. Aussi les CYP450 compétitionnent pour les électrons de cette réductase (Li et coll., 1999). La conséquence est l'inhibition de l'activité enzymatique médiée par un CYP450 au profit d'une augmentation de l'activité enzymatique médiée par un autre CYP450. Il serait donc intéressant de savoir comment la cirrhose affecte la disponibilité du NADPH. Une disponibilité du NADPH réduite en présence de la maladie et un grand nombre de substrats pourrait peut-être expliquer le fait que certaines enzymes soient plus affectées que d'autres par la maladie. Enfin, l'implication d'autres facteurs inconnus et d'un mécanisme complexe est aussi probable. En dépit de toutes ces suppositions, nous ne connaissons pas le mécanisme par lequel l'activité du CYP2C19 est diminuée en présence de la maladie. Ce mécanisme nous semble complexe et reste à élucider.

Nous pouvons seulement supposer que ce n'est pas le même mécanisme que celui qui régule la diminution d'activité des autres isoenzymes.

Les changements dans la fonction hépatique peuvent être dus soit à une insuffisance hépatique, soit à une architecture ou une perfusion vasculaire modifiée. Une étude menée par Arns et coll. (1997) a démontré que l'étude du métabolisme de la méphénytoïne racémique pourrait être d'une utilité potentielle pour distinguer les mécanismes qui contribuent au dysfonctionnement métabolique hépatique. Comme le CYP2C19 est responsable du métabolisme de cette molécule, ceci pourrait être un bon

point de départ pour élucider le mécanisme qui rend cette isoenzyme très susceptible à la maladie.

CONCLUSION

En conclusion, cette étude démontre que les activités des isoenzymes CYP450 1A2, 3A4, 2C19 et 2E1 sont affectées différemment par la maladie. Le CYP2C19 est très sensible à la maladie alors que le CYP2E1 n'est pas affecté par la maladie. Quant aux CYP3A4 et 1A2, ils sont affectés par la maladie à un degré dépendant de sa sévérité. Contrairement à ce qu'on pourrait penser, une maladie du foie ne signifie donc pas nécessairement une diminution du métabolisme des médicaments. Aussi, bien qu'il y ait des exceptions, il semble y avoir une certaine corrélation entre les activités des isoenzymes en présence de la maladie.

Nos résultats ont des implications cliniques importantes. En effet, plusieurs études parlent d'ajustement du dosage des médicaments chez les patients avec maladie du foie. Or, d'après nos observations, il ne serait par exemple pas judicieux de prescrire aux patients des médicaments qui sont des substrats du CYP2C19 afin d'éviter leur accumulation dans le sang et donc de la toxicité. Il est donc important de tenir compte de l'enzyme qui métabolise un médicament donné, avant de faire des recommandations de dosage chez ces patients.

Enfin, le phénotypage des CYP450 2C19 et 2E1 pour évaluer la réserve fonctionnelle hépatique ne semble pas adéquat comme tests quantitatifs. En effet, ces deux isoenzymes sont respectivement trop affectée et pas assez affecté par la maladie pour pouvoir nous donner une idée de l'état du foie.

Pour donner suite à cette étude, il serait intéressant de chercher à élucider le mécanisme par lequel l'activité du CYP2C19 est diminuée, d'évaluer d'autres sondes comme tests quantitatifs de la fonction hépatique, évaluer l'impact de l'étiologie sur l'activité

d'autres isoenzymes. Il est important de mentionner qu'une compréhension des mécanismes menant à la diminution de la capacité métabolique pourrait être d'une utilité clinique.

RÉFÉRENCES:

ADEDOYIN.A, ARNS.PA, RICHARDS.WO, WILKINSON.GR and BRANCH.RA (1998): Selective effect of liver disease on the activities of specific metabolizing enzymes: investigation of cytochromes P450 2C19 and 2D6. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 1, 8-17.

AMANTEA.A and NARANG.PR. (1988): Improved procedure for quantitation of omeprazole and metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 426, 216-222.

ARIAS, POPPER, SCHACHTER and SHAFRITZ. *The liver. Biology and Pathology*. Raven press, New York, 1982. 23-29.

ARNS.PA, ADEDOYIN.A, DIBISCEGLIE.AM, WAGGONER.JG, HOOFNAGLE.JH, WILKINSON.GR and BRANCH.RA. (1997): Mephenytoin disposition and serum bile acids as indices of hepatic function in chronic viral hepatitis. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 5, 527-537.

BALIAN.J.D, SUKHOVA.N, HARRIS.J.W, HEWETT.J, PICKLE.L, GOLDSTEIN.J.A, COLL. (1995): The hydroxylation of omeprazole correlates with s-mephenytoin metabolism: a population study. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 57, 662-667.

BENHAMOU.JP et ERLINGER.S. Maladies du foie et des voies biliaires. Flammarion Médecine Sciences, Paris, 1986. 3-15 et 72-76.

BIRCHER.J. (1983): Quantitative assessment of deranged hepatic function: a missed opportunity? *Seminars in Liver Disease*.3, 275-284.

BIRCHER.J and SHARIFI.S : Drug dosage in patients whit liver disease. In: Mc Intyre.N, Benhamou.JP, Bircher.J, Rizzetto.M and Rodes.J. *Oxford textbook of clinical hepatology*, Vol 2. Oxford University Press, New York, 1991. 1388-1399.

BRANCH.RA. (1998): Drugs in liver disease. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 64, 462-465.

CARRIERE.V, GOASDUFF.T, RATANASAVANH.D, MOREL.F, GAUTHIER.JC, GUILLOUZO.A and COLL.(1993): Both cytochromes P450 2E1 and 1A1 are involved in the metabolism of chlorzoxazone. *Chemical Research and Toxicology*. 6, 852-857.

CHANG.M, DAHL.ML, TYBRING.G, GOTHARSON.E and BERTILSSON.L. (1995): Use of omeprazole as a probe drug for CYP2C19 phenotype in Swedish Caucasians: comparison with S-mephenytion hydroxylation phenotype and CYP2C19 genotype. *Pharmacogenetics*. 5, 358-363.

CONN.HO. (1981): A peek at the Child-Turcotte classification. *Hepatology*, 1, 673-676

COVERDALE.SA, SAMARASINGHE.DA, LIN.R, KENCH.J, BYTH.K, KHAN.MH, CREWE.E, LIDDLE.C, GEORGE.J and FARRELL.GC. (2003): Changes in antypirine clearance and platelet count, but not conventional liver tests, correlate with fibrotic change in chronic hepatitis C: value for predicting fibrotic progression. *American Journal of Gastroenterology*. 98, 1384-1390.

DI BISCEGLIE.AM, GOODMAN.ZD, ISHAK.KG, HOOFNAGLE.JH, MELPOLDER.JJ and ALTER.HJ. (1991): Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology*. 6, 969-974.

DIENSTAG.J: Hepatitis C: natural history and prognostic factors. In: *HCV infection: epidemiology, diagnosis, and treatment*. Schering Corporation Oncology Biotech, Dallas, 1997. 9-10.

FARRELL.GC, COOKSLEY.WGE and POWELL.LW. (1979) : Drug metabolism in liver disease: activity of hepatic microsomal metabolizing enzymes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 26, 483-492.

FLOCKHART.DA. (1995): Drug interactions and the cytochrome P450 system - The role of cytochrome P450 2C19. *Clinical Pharmacokinetics*. 29, 45-52.

FRYE.FR, MATZKE.GR, ADEDOYIN.A, PORTER.JA and BRANCH.RA. (1997): Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 4, 365-376.

FRYE.FR and STIFF.DD. (1996): Determination of chlorzoxazone and 6-hydroxychlorzoxazone in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 686, 291-296.

GARIEPY.L and VILLENEUVE.JP. (1990): Drug use in patients with hepatic disease. *Current Therapy in Gastroenterology and Liver Disease*.3, 420-424.

GASCON.MP and DAYER.P: Hepatic metabolism of drugs and toxins. In: Mc Intyre.N, Benhamou.JP, Bircher.J, Rizzetto.M and Rodes.J. Oxford textbook of clinical hepatology, Vol 1. Oxford University Press, New York, 1991. 247-258.

GEORGE.J, MURRAY.M, BYTH.K and FARRELL.GC. (1995): Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology*. 21, 120-128.

GORSKI.JC, JONES.DR, WRIGHTON.A and HALL.SD. (1997): Contribution of human CYP3A subfamily members to the 6-hydroxylation of chlorzoxazone. *Xenobiotica*. 27, 243-256.

HEATHCOTE.J : Cirrhose du foie. www.gastroresource.com/GiTextbook/Fr/chapter14

ISHIZAKI.T and HORAI.Y. (1999): Review article: cythochrome P450 and the metabolism of proton pump inhibitors-emphasis on rabeprazole. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 3, 27-36.

JAYYOSI.Z, KNOBLE.D, MUC.M, ERICK.J, THOMAS.PE and KELLEY.M. (1995): Cytochrome P-450 2E1 is not the sole catalyst of chlorzoxazone hydroxylation in rat liver microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 273, 1156-1161.

KIVISTO.KT and KROEMER.HK. (1997): Use of probe drugs as predictors of drug metabolism in humans. *Journal of Clinical Pharmacology*. 37, 40s-48s.

KIYOSAWA.K, SODEYAMA.T, TANAKA.E, GIBO.Y, YOSHIZAWA.K, NAKANO.Y, FURUTA.S, AKAHANE.Y, NISHIOKA.K, PURCELL.RH and ALTER.HJ. (1990): Interrelationship of blood transfusion, Non-A, Non-B hepatitis and

hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology*.12, 671-675.

KOBAYASHI.K, CHIBA.K, SOHN.DR, KATO.Y and ISHIZAKI.T. (1992): Simultaneous determination of omeprazole and its metabolites in plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with an alkaline-resistant polymer-coated C₁₈ column. *Journal of Chromatography*. 579, 299-305.

KOVACS.P, EDWARDS.DJ, LALKA.D, SCHEIWE.WM and STOECKEL.K. (1999): High-dose omeprazole: use of a multiple-dose study design to assess bioequivalence and accuracy of CYP2C19 phenotyping. *Therapeutics Drug Monitoring*. 21, 526-531.

LAUER.GM and WALKER.BD. (2001): Hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*. 345, 41-51.

LI.DN, PRITCHARD.MP, HANLON.SP, BURCHELL.B, WOLF.CR and FRIEDBERG.T. (1999): Competition between cytochrome P-450 isozymes for NADPH-Cytochrome P-450 oxidoreductase affects drug metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 289, 661-667.

LIBERHERR.R. (2001): www.e-sante.fr/magazine/article_828_172.htm

LOTTERER.E, HOGEL.J, GAUS.W, FLEIG.WE and BIRCHER.J. (1997): Quantitative liver function tests as surrogate markers for end-points in controlled clinical trials: a retrospective feasibility study. *Hepatology*. 26, 1426-1433.

LOWN.K, KOLARS.J, TURGEON.K, MERION.R, WRIGHTON.SA and WATKINS.PB. (1992): The erythromycin breath test selectively measures P450 III A in patients with severe liver disease. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 51, 229-238.

LUCAS.D, FERRARA.R, GONZALEZC.E, BODENEZ.P, ALBORES.A, MANNO.M, and COLL. (1999): Chlorzoxazone, a selective probe for phenotyping CYP2E1 in humans. *Pharmacogenetics*. 9, 377-388.

MARINAC.JS, BALIAN.JD, FOXWORTH.JW, WILLSIE.SK, DAUS.JC, OWEN.R and COLL. (1996): Determination of CYP2C19 phenotype in black Americans with omeprazole: correlation with genotype. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 60, 138-144.

MC COLL.K and KENNERLEY.P. (2002): Proton pump inhibitors—differences emerge in hepatic metabolism. *Digestive and Liver Disease*. 34, 461-467

MORGAN.DJ and MCLEAN.AJ. (1995): Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in patients with liver disease. *Clinical Pharmacokinetics*. 29, 370-391.

MURRAY.M. (1992): P450 Enzymes. Inhibition mechanisms, genetic regulation and effects of liver disease. *Clinical Pharmacokinetics*. 23, 132-146.

NEBERT.DW and RUSSELL.DW. (2002): Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*. 360, 115- 1162.

OMURA.T and SATO.R.(1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry*. 329, 2370-2378.

PERRI.F, PASTORE.M, ANNESE.V and ANDRIULLI.A. (1994): The aminopyrine breath test. *Italian Journal of Gastroenterology*. 26, 306-317.

PRATT.DS and KAPLAN.MM: Evaluation of the liver. A: Laboratory tests. In: SCHIFF.ER, SORRELL.MF, MADDREY.WC. *Diseases of the liver*, 8th edition vol 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1999. 205-244.

PUGH.RN, MURRAY-LYON.IM, DAWSON.JL, PIETRONI.MC. and WILLIAMS.R (1973): Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *British Journal of Surgery*. 60, 646-649.

REALDI.G, ALBERTI.A, RUGGE.M, RIGOLI.AM, TREMOLADA.F, SCHIVAZAPPA.L and RUOL.A. (1982): Long-term follow-up of acute and chronic non-A, non-B post-transfusion hepatitis: evidence of progression to liver cirrhosis. *Gut*. 23, 270-275.

REICHEN.J. (1995): Assessment of hepatic function with xenobiotics. *Seminars In Liver Disease*.15, 189-201.

REICHEN.NJ. (1999): Les fonctions du foie. www.ikp.unibe.ch/lab2/hepfxfl.html.

SCHIFF.L and SCHIFF.ER. Diseases of the liver 7th edition, vol 2. JB.Lippincott Company, Philadelphia, 1993. 875-923.

SITE aol : www.pagesperso.aol.fr/transhepat/fo-structure.html

SPIGSET.O, HAGGA.S, SODERSTROM.E and DAHLQVIST.R. (1999): The paraxanthine: caffeine ratio in serum or in saliva as a measure of CYP1A2 activity: when should the sample be obtained? *Pharmacogenetics*. 9, 409-412.

STREETMAN.DS, BERTINO Jr.JS and NAFZIGER.AN. (2000): Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults:a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*.10,187-216.

STREETMAN.DS, BLEACKLEY.JF, JOORAN.SK, NAFZIGER.AN, LEEDER.JS, GAEDIGK.A and COLL. (2000): Combined phenotypic assessment of CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxydase whit the "Cooperstown cocktail". *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 68, 375-383.

TANAKA.E. (1992): Simultaneous determination of caffeine and its primary demethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 4, 311-314.

TONGE.RP, KELLY.EJ, BRUSCHI.SA, KALHORN.T, EATON.DL, NEBERT.DW and NELSON.SD. (1998): Inhibition and induction of cytochrome P450 2E1-catalyzed oxidation by isoniazid in humans. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 153,102-108.

TREMOLADA.F, CASARIN.C, ALBERTI.A, DRAGO.C, TAGGER.A, RIBERO.ML and REALDI.G. (1992): Long-term follow-up of non-A, non-B (Type C) post-transfusion hepatitis. *Journal of Hepatology*. 16, 273-281.

TURGEON.DK, LEICHTMAN.AB, LOWN.KS and COLL. (1994): P450 3A activity and cyclosporine dosing in kidney and heart transplant recipients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 56, 253-260.

VIDALI.M, STEWART.SF, ROLLAR, DALY.AK, CHEN.Y, MOTTARAN.E, JONES.DE, LEATHART.JB, DAY.CP and ALBANO.E. (2003): Genetic and epigenetic factors in autoimmune reactions toward cytochrome P450 2E1 in alcoholic liver disease. *Hepatology*. 37, 410-409.

VILLENEUVE.JP, INFANTE-RIVARD.C, AMPELAS.M, POMIER-LAYRARGUES.G, HUET.PM and MARLEAU.D. (1986): Prognostic value of the aminopyrine breath test in cirrhotic patients. *Hepatology* . 6, 928-931.

VILLENEUVE.JP, ARSÈNE.D and HUET.PM. (1983): Assessment of liver function by the aminopyrine breath test. *Clinical and Investigative Medicine*. 6, 5-9.

VILLENEUVE.JP and PICHETTE.V. (2004): Cytochrome P450 and liver diseases. *Current Drug Metabolism*. 5, 1-10.

WATKINS.PB. (1990): The cytochromes P-450. *Viewpoints on Digestive Diseases*. 22, 7-12.

WATKINS.PB, HAMILTON.TA, ANNESLEY.TM and COLL. (1990): The erythromycin breath test as a predictor of cyclosporine blood levels. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 48, 120-129.

WATKINS.PB, MURRAY.SA, WINKELMAN.LG, HEUMAN.DM, WRIGHTON.SA, and GUZELIAN.PS. (1989): Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P-450-Studies in rats and patients. *Journal of Clinical Investigation*. 83, 688-697.

WEDLUND.JP. (2000): The CYP2C19 enzymes polymorphism. *Pharmacology*. 61, 174-183.

WHILLOCK.JP Jr AND DENISON.MS: Induction of cytochrome P450 enzymes that metabolize xenobiotics. In: Ed.Ortiz de Montellano PR. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. Plenum Press, New York, 1995. 367-391.

WILKINSON.GR, SCHENKER.S. (1975): Drug disposition and liver disease. *Drug Metabolism Reviews*. 4, 4139-175.

XIE.HG, STEIN.CM, KIM.RB, WILKINSON.GR, FLOCKHART.DA and WOOD.AJJ. (1999): Allelic, genotypic and phenotypic distributions of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) in healthy caucasian populations of european descent throughout the world. *Pharmacogenetics*. 9, 539.

ZAIGLER.M, TANTCHEVA-POOR.I and FUHR.U. (2000): Problems and perspectives of phenotyping for drug-metabolizing enzymes in man. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics. 37, 1-9.

ZAKIM and BOYER. Hepatology: A text book of liver disease. 2nd edition vol 1.

W.B saunders company, Philadelphia , USA, 1990. 3-7.

ZHU.B, OU-YANG.DS, CHEN.XP, HUANG.SL, TAN.ZR, HE.N and COLL. (2001): Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 70, 455-461.