

Université de Montréal

**Modulation de l'activité des CYP1A2 et CYP3A6 par des dérivés  
radicalaires de l'oxygène**

Par  
Joëlle Batonga

Département de pharmacologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Science (M.Sc.)  
en pharmacologie

Juillet 2006

© Joëlle Batonga, 2006



W  
4  
U58  
2007  
V.086

**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 :

**Modulation de l'activité des CYP1A2 et CYP3A6 par des formes  
radicalaires de l'oxygène**

Présenté par :  
Joëlle Batonga

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Vincent Pichette  
Président-rapporteur

Dr. Patrick du Souich  
Directeur de recherche

Dr. Pierre-André Lavoie  
Membre du Jury

## RÉSUMÉ

Chez le lapin, une réaction inflammatoire aiguë induite par l'injection de térébenthine (RIA) diminue l'activité et l'expression des isoformes du cytochrome P450 (P450), phénomène qui peut être reproduit *in vitro* en incubant du sérum d'un lapin avec une RIA (SRIA) avec des hépatocytes provenant d'un lapin avec une réaction inflammatoire. Les antioxydants et l'inhibition de la synthèse de NO $\cdot$  préviennent la diminution d'activité du CYP1A2 produite par le SRIA, ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse que les dérivés radicalaires de l'oxygène (DROs) sont impliqués dans la diminution de l'activité des isoformes du cytochrome P450. Afin de déterminer le rôle des DROs, nous avons mesuré la production de peroxyde d'hydrogène (H $_2$ O $_2$ ) et de monoxyde d'azote (NO $\cdot$ ) dans des hépatocytes de lapin témoins (HTÉM) et dans des hépatocytes de lapins ayant une RIA (HRIA). Nous avons également mesuré l'effet du H $_2$ O $_2$  sur l'activité des CYP1A2 et CYP3A6. Pour vérifier le rôle des DROs dans l'inactivation des isoformes du P450, nous avons incubé les HTÉM et les HRIA avec de l'IL-6 et du SRIA, puis nous avons mesuré la production de H $_2$ O $_2$ , de NO $\cdot$  ainsi que l'activité des CYP1A2 et CYP3A6. Finalement, nous avons inhibé diverses sources de radicaux libres: les complexes respiratoires I, II et III des mitochondries, la voie de la céramide et la NADPH oxidase, et analysé si ces manœuvres prévenaient l'inhibition de l'activité des isoformes du cytochrome P 450 par le SRIA/IL-6.

Dans les HRIA, l'activité des isoformes du P450 est inférieure à celle mesurée dans les HTÉM, tandis que la quantité de H $_2$ O $_2$  est augmentée. L'addition de IL-6 et de SRIA aux hépatocytes diminue l'activité mais n'affecte pas la production de H $_2$ O $_2$ . La quantité de NO $\cdot$  n'est pas augmentée dans les HRIA mais est augmentée par l'addition de SRIA. La présence d'inhibiteurs mitochondriaux et d'inhibiteurs de la NADPH oxidase ne

prévient pas la diminution d'activité produite par le SRIA/IL-6. Au contraire, l'inhibition du complexe III des mitochondries et l'inhibition non spécifique de flavoprotéines par la DPI l'accentuent.

Le  $H_2O_2$  provenant des mitochondries et de la NADPH oxydase et le  $NO\cdot$  ne semblent pas jouer un rôle dans la diminution de l'activité des isoformes du P450 observée lors de la réaction inflammatoire. Nous proposons que cette diminution d'activité est modulée par un autre radical libre l'ion peroxyde nitrite.

Mots-clés : cytochrome P450, radicaux libres, mitochondries, NADPH oxydase, céramide, monoxyde d'azote, peroxyde d'hydrogène, peroxyde nitrite

## **ABSTRACT**

In rabbits, an acute inflammatory reaction induced by the injection of turpentine (AIR) causes a decrease in cytochrome P450 (P450) activity and expression. These changes can be reproduced *in vitro* by incubating the serum of a rabbit with AIR ( $S_{\text{infla}}$ ) with hepatocytes from a rabbit with AIR. Antioxidants can prevent the decrease in CYP1A2 activity induced by  $S_{\text{infla}}$  which led us to the hypothesis that reactive oxygen species (ROS) are involved in the inactivation of cytochrome P450 enzymes. In order to determine the role of ROS, we measured hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and nitric oxide ( $NO\cdot$ ) production in control hepatocytes ( $H_{\text{cont}}$ ) and hepatocytes from rabbits with an AIR ( $H_{\text{infla}}$ ). We also measured the effect of  $H_2O_2$  on CYP1A2 and CYP3A6 activity. To verify the role of ROS in P450 isoforms inactivation, we incubated  $H_{\text{cont}}$  and  $H_{\text{infla}}$  with IL-6 and  $S_{\text{infla}}$ , and then measured  $H_2O_2$  and  $NO\cdot$  production as well as CYP1A2 and CYP3A6 activity. Finally, we inhibited several sources of ROS: mitochondrial respiratory complexes I, II and III, the ceramide synthesis pathway and NADPH oxidase and analyzed if these manipulations could prevent the inhibition of P450 activity by  $S_{\text{infla}}$ /IL-6.

In  $H_{\text{infla}}$ , the activity of P450 isoforms is lower than in  $H_{\text{cont}}$  whereas  $H_2O_2$  production is increased. Adding IL-6 and  $S_{\text{infla}}$  to the hepatocytes decreased the activity but did not affect  $H_2O_2$  production.  $NO\cdot$  concentration was not increased in  $H_{\text{infla}}$  but was increased by adding  $S_{\text{infla}}$ . The presence of inhibitors of the mitochondrial respiratory complexes and of NADPH oxidase and ceramide synthesis did not prevent the decrease in activity induced by  $S_{\text{infla}}$ /IL-6. On the contrary, mitochondrial complex III inhibition and non specific flavoprotein inhibition by DPI accentuated that decrease.

We thus concluded that ROS from mitochondria and NADPH oxidase do not seem to play a role in the inactivation of cytochrome P450 isoforms during an AIR. We propose that this inactivation is mediated by another free radical, the peroxynitrite ion.

Keywords: cytochrome P450, free radicals, mitochondria, NADPH oxidase, ceramide, nitric oxide, hydrogen peroxide, peroxynitrite



## TABLE DES MATIÈRES

RESUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	v
TABLES DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xvii
REMERCIEMENTS.....	xix
INTRODUCTION.....	1
<b>PARTIE I : LE CYTOCHROME P450.....</b>	<b>2</b>
<b>I- Le métabolisme.....</b>	<b>2</b>
<b>II- Historique du cytochrome P450.....</b>	<b>3</b>
<b>III- Structure et mécanisme d'action du cytochrome P450.....</b>	<b>4</b>
<b>IV- Isoformes du cytochrome P450.....</b>	<b>8</b>
1- La famille CYP1.....	9
2- La famille CYP2.....	9
3- La famille CYP3.....	10
<b>V- Rôle physiologique.....</b>	<b>11</b>
1- Métabolisme du cholestérol et synthèse de la bile.....	11
2- Synthèse et métabolisme des stéroïdes.....	12
3- Métabolisme de l'acide arachidonique et des eicosanoides.....	13
4- Synthèse et métabolisme de la vitamine D3.....	14
5- Hydroxylation de l'acide rétinoïque.....	14
6- Production de monoxyde d'azote (NO).....	15
7- Fonctions inconnues.....	15
<b>VI- Facteurs influençant l'expression et l'activité du cytochrome P450...</b>	<b>16</b>
1- Polymorphismes génétiques.....	16
2- Physiologie.....	16
3- Spécificité tissulaire.....	18
4- Nutrition.....	18

5-	Xénobiotiques, alcool et cigarettes.....	19
6-	Pathologies.....	20
<b>VII-</b>	<b>Mécanismes de régulation.....</b>	<b>21</b>
1-	Mécanismes d'induction.....	21
1.1	Le récepteur Ah.....	21
1.2	Les récepteurs nucléaires.....	22
1.3	Mécanismes non-transcriptionnels.....	25
2-	Mécanismes d'inhibition.....	26
2.1	Inhibition réversible.....	26
2.2	Inhibition quasi-irréversible.....	27
2.3	Inhibition irréversible.....	27
<b>PARTIE II : LA RÉGULATION DU CYTOCHROME P450 LORS DE L'INFLAMMATION.....</b>		<b>29</b>
<b>I-</b>	<b>L'inflammation.....</b>	<b>29</b>
1-	Définition.....	29
2-	Les médiateurs de la réponse inflammatoire aiguë.....	31
2.1	Histamine et sérotonine.....	31
2.2	Les protéases plasmatiques.....	32
2.3	Les eicosanoïdes.....	33
2.4	Le PAF.....	33
2.5	Les neuropeptides.....	34
2.6	Les radicaux libres.....	34
2.7	Les cytokines.....	35
<b>II-</b>	<b>Régulation du cytochrome P450 par l'inflammation.....</b>	<b>36</b>
1-	Régulation du cytochrome P450 par l'infection.....	36
2-	Régulation du cytochrome P450 par l'inflammation.....	37
<b>III-</b>	<b>Mécanismes de régulation du cytochrome P450 par l'inflammation...</b>	<b>39</b>
1-	Mécanismes pré-transcriptionnels de régulation par les cytokines.....	41
2-	Mécanismes post-transcriptionnels de régulation par les cytokines....	41
3-	Monoxyde d'azote et dérivés radicalaires de l'oxygène.....	42
<b>PARTIE III : LES RADICAUX LIBRES.....</b>		<b>44</b>
<b>I-</b>	<b>Définition.....</b>	<b>44</b>
1-	Les dérivés radicalaires de l'oxygène.....	44
2-	Les dérivés radicalaires de l'azote.....	45

<b>II-</b>	<b>Les sources des dérivés radicalaires de l'oxygène.....</b>	<b>46</b>
	1- La NADPH oxydase.....	46
	2- La cyclo-oxygénase.....	47
	3- Les lysosomes et les péroxysomes.....	47
	4- Le cytochrome P450.....	48
	5- La xanthine oxydo-réductase.....	49
	6- Les mitochondries.....	49
	7- Autres sources non-enzymatiques.....	52
<b>III-</b>	<b>Rôle physiologique des dérivés radicalaires de l'oxygène.....</b>	<b>52</b>
	1- Les radicaux libres et la signalisation cellulaire.....	52
	1.1 Modulation de l'expression génique.....	53
	1.2 Modulation de l'activité des kinases et des phosphatases.....	53
	1.3 Régulation du calcium intracellulaire.....	54
	1.4 Autres rôles.....	55
	2- Mécanisme d'action des dérivés radicalaires de l'oxygène.....	55
	2.1 Altération de l'état rédox de la cellule.....	55
	2.2 Modification directe des protéines.....	56
	3- Les dérivés radicalaires de l'oxygène et la pathologie.....	57
	4- Systèmes antioxydants.....	59
	<b>PROJET DE RECHERCHE.....</b>	<b>61</b>
<b>I-</b>	<b>HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....</b>	<b>62</b>
<b>II-</b>	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>65</b>
	1- Induction de la réaction inflammatoire et isolation des hépatocytes...	65
	2- Inhibition des sources de dérivés radicalaires de l'oxygène.....	67
	2.1 Détermination de la concentration des inhibiteurs.....	67
	2.2 Protocole.....	68
	3- Préparation du sérum et de l'interleukine-6.....	69
	4- Mesure de la production de peroxyde d'hydrogène.....	69
	4.1 Principes d'utilisation de la sonde.....	69
	4.2 Protocole.....	71
	5- Mesure de la production de monoxyde d'azote.....	71
	5.1 Principe de la réaction.....	71
	5.2 Protocole.....	72
	6- Mesure de l'activité du CYP1A2.....	73
	7- Mesure de l'activité du CYP3A6.....	73
	8- Expression des CYP1A2 et CYP3A6.....	74
	9- Analyses statistiques.....	76
	10- Matériels.....	76

<b>III- RÉSULTATS.....</b>	<b>78</b>
1- Concentration de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et activité des CYP1A2 et CYP3A6 pendant la réaction inflammatoire.....	78
2- Relation entre le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et l'activité des isoformes CYP1A2 et CYP3A6.....	79
3- Étude du rôle potentiel des dérivés radicalaires de l'oxygène dans la diminution d'activité des CYP1A2 et CYP3A6.....	81
3.1 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur les concentrations de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans les hépatocytes.....	81
3.2 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'activité du CYP1A2...	85
3.3 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'activité du CYP3A6...	88
3.4 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'expression du CYP1A2 et du CYP3A6.....	91
4- Effet du sérum d'un lapin avec une réaction inflammatoire sur l'activité des CYP1A2 et CYP3A6... ..	92
4.1 Effet du sérum d'un lapin avec une réaction inflammatoire sur les concentrations de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	93
4.2 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur la diminution d'activité du CYP1A2 produite par le sérum de lapin avec une réaction inflammatoire.....	96
4.3 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur la diminution d'activité du CYP3A6 produite par le sérum de lapin avec une réaction inflammatoire.....	99
5- Effet de l'interleukine-6 sur l'activité des CYP1A2 et CYP3A6.....	102
5.1 Effet de l'interleukine-6 sur les concentrations de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	103
5.2 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'activité du CYP1A2 dans des hépatocytes incubés avec de l'interleukine-6.....	106
5.3 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'activité du CYP3A6 dans des hépatocytes incubés avec de l'interleukine-6.....	109
6- Étude du rôle du NO <sup>•</sup> dans la diminution d'activité des CYP1A2 et CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire.....	112
6.1 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur la concentration de NO <sup>•</sup> .....	113
6.2 Effet du sérum sur la concentration de NO <sup>•</sup> .....	116

6.3 Effet de l'interleukine-6 sur la concentration de NO <sup>•</sup> .....	119
<b>IV- DISCUSSION.....</b>	<b>122</b>
1- Le peroxyde d'hydrogène dans la réaction inflammatoire.....	123
2- Sources de peroxyde d'hydrogène dans les hépatocytes de lapins.....	126
3- Effet du DMSO, de la roténone, du myxothiazole, du TTFA, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'activité des CYP1A2 et CYP3A6.....	128
4- Effet du sérum sur l'activité des CYP1A2 et CYP3A6.....	130
5- Effet l'interleukine-6 sur l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6.....	133
6- Implication d'autres dérivés radicalaires dans la diminution d'activité des isoformes du cytochrome P450.....	134
7- Autres sources de dérivés radicalaires de l'oxygène et de NO <sup>•</sup> dans l'hépatocyte.....	137
8- Mécanismes d'action des dérivés radicalaires de l'oxygène.....	138
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>144</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1. Exemples de pathologies chez l'humain où les isoformes du cytochrome P450 sont modifiés.....	20
Tableau 2. Pathologies associées aux stress oxydatif.....	56
Tableau 3. Concentration de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et activité des CYP1A2 et CYP3A6 déterminées dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H <sub>cont</sub> ) et dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire (H <sub>infla</sub> ). *p <0,05 comparé à H <sub>cont</sub> .....	75
Tableau 4. Activités du CYP1A2 et du CYP3A6 dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H <sub>cont</sub> ) et de lapins avec une réaction inflammatoire (H <sub>infla</sub> ), en présence ou en absence de sérum d'un lapin ayant une réaction inflammatoire (témoin ou +S <sub>infla</sub> ). * p<0,05 comparé au témoin.....	89
Tableau.5 Activités du CYP1A2 et du CYP3A6 dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H <sub>cont</sub> ) ou de lapins avec une réaction inflammatoire (H <sub>infla</sub> ), en présence ou en absence d'IL-6 (témoin ou témoin + IL6). * p<0,05 comparé au témoin.....	99
Tableau 6. Concentration de NO <sup>•</sup> dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H <sub>cont</sub> ) et de lapins avec une réaction inflammatoire (H <sub>infla</sub> ).....	109

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure du cytochrome P450. Source : <a href="http://www.p450.kvl.dk/gallery/">www.p450.kvl.dk/gallery/</a> .....	5
Figure 2. Cycle catalytique du cytochrome p450, Source : <a href="http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/">www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/</a> .....	6
Figure 3. Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires lors de la régulation du cytochrome P450. L'hétérodimère formé par le récepteur et le RXR va lier des éléments de réponse sur l'ADN basé sur la séquence AGGTCA. Les éléments de réponse sont souvent des répétitions imparfaites de la séquence AGGTCA.....	22
Figure 4. Élément de réponse au Phénobarbital sur les gènes de la famille CYP2B: Les gènes contiennent de site de liaison au récepteur nucléaire (NR1 et NR2) autour d'un site de liaison à un facteur de transcription (NF-1). Chaque site de liaison est constitué de 2 répétitions directes espacées par 4 bases (DR4).....	23
Figure 5. Les principaux dérivés radicalaires de l'oxygène et leur source.....	44
Figure.6 La chaîne de transport des électrons dans les mitochondries. Source : <a href="http://www.prism.gatech.edu/">http://www.prism.gatech.edu/</a> .....	48
Figure.7 Sites de formation de l'ion superoxyde dans la chaîne respiratoire. Adapté, de Turrens, 2003.....	49
Figure 8 Inhibiteurs utilisés pour prévenir la formation de dérivés radicalaires de l'oxygène dans les hépatocytes.....	61
Figure 9 Activité du CYP3A6 en fonction de différentes concentrations de roténone (—), de myxothiazole (· ·) de TTFA (--) de fumonisin B1 (—•—) de DPI (— —) et d'apocynine (—•—). Concentrations en mM.....	66
Figure 10. Fluorescence de la dichlorofluorescéine (DCF) en fonction de concentrations croissantes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en absence de cellules (concentrations en mM)...	67
Figure 11. (A) Fluorescence du DCFH en présence de concentrations croissantes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans des hépatocytes de lapins témoins, n = 1. (B) Activité du CYP1A2 en présence de concentrations croissantes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , n = 3. (C) Activité du CYP3A6 en présence de concentrations croissantes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , n = 6. *, p<0,05 comparé au témoin.....	77
Figure 12. Concentration de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans des hépatocytes procédant de lapins témoins et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. *, p<0,05 comparé au témoin, n = 5.....	80

Figure 13. Concentration de  $H_2O_2$  dans des hépatocytes procédant de lapins témoin ( $H_{cont}$ ) et de lapins avec une réaction inflammatoire ( $H_{infla}$ ), incubés avec de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à  $H_{infla}$ , &  $p < 0,05$  comparé à  $H_{cont}$ ,  $n = 5$ ..... 81

Figure 14. Expression (A) et changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin) (B), dans des hépatocytes procédant de lapins témoins et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 6$ ..... 83

Figure 15. Expression (A) et changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 11$ ..... 84

Figure 16. Expression (A) et changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin) (B), dans des hépatocytes procédant de lapins témoins et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 18$ ..... 86

Figure 17. Expression (A) et changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin) (B), dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 20$ ..... 87

Figure 18. Concentration de  $H_2O_2$  dans des hépatocytes procédant de lapins témoins ( $H_{cont}$ ), incubés avec du sérum ( $S_{infla}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à  $S_{infla}$ ,  $n = 5$ ..... 91

Figure 19. Concentration de  $H_2O_2$  dans des hépatocytes procédant de lapins témoins ( $H_{cont}$ ) et de lapins avec une réaction inflammatoire ( $H_{infla}$ ), incubés avec du sérum ( $S_{infla}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à  $S_{infla}$ , &  $p < 0,05$  comparé à  $H_{cont}$ ,  $n = 5$ ..... 92

Figure 20. Changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes procédant de lapins témoins, incubés avec du sérum de lapin avec une réaction inflammatoire ( $S_{infla}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à  $S_{infla}$ ,  $n = 6$ ..... 94

Figure 21. Changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire,



incubés avec du sérum de lapin avec une réaction inflammatoire ( $S_{infla}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à  $S_{infla}$ , &  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 10$ ..... 95

Figure 22. Changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes procédant de lapins témoins, incubés avec du sérum de lapin avec une réaction inflammatoire ( $S_{infla}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à  $S_{infla}$ ,  $n = 4$ ..... 97

Figure 23. Changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire, incubés avec du sérum de lapin avec une réaction inflammatoire ( $S_{infla}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à  $S_{infla}$ , &  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 12$ ..... 98

Figure 24. Concentration de  $H_2O_2$  dans des hépatocytes procédant de lapins témoins ( $H_{cont}$ ), incubés avec de l'interleukine-6 (IL-6) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à IL-6,  $n = 5$ ..... 101

Figure 25. Concentration de  $H_2O_2$  dans des hépatocytes procédant de lapins témoins ( $H_{cont}$ ) et de lapins avec une réaction inflammatoire ( $H_{infla}$ ), incubés avec de l'interleukine-6 (IL-6) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, de DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à IL-6, &  $p < 0,05$  comparé à  $H_{cont}$   $n = 5$ ..... 102

Figure 26. Changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes procédant de lapins témoins, incubés avec de l'interleukine-6 (IL-6) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.  $n = 4$ ..... 104

Figure 27. Changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire, incubés avec de l'interleukine-6 (IL-6) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à IL-6, &  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 3$ ..... 105

Figure 28. Changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes procédant de lapins témoins, incubés avec de l'interleukine-6 (IL-6) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à IL-6, &  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 13$ ..... 107

Figure 29. Changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin) dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire,

- en présence d'interleukine-6 (IL-6) et de DMSO, de roténone, de TTFA, de myxothiazole, de fumonisine B1, de DPI et Apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à IL-6, &  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 8$ ..... 108
- Figure 30. Concentration de  $\text{NO}^{\cdot}$  dans des hépatocytes procédant de lapins témoins ( $H_{\text{cont}}$ ) et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.  $n = 4$ ..... 110
- Figure 31. Concentration de  $\text{NO}^{\cdot}$  dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire ( $H_{\text{infla}}$ ) et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine.  $n = 3$ ..... 111
- Figure 32. Concentration de  $\text{NO}^{\cdot}$  dans des hépatocytes procédant de lapins témoins ( $H_{\text{cont}}$ ), incubés avec du sérum ( $S_{\text{infla}}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine..... 113
- Figure 33. Concentration de  $\text{NO}^{\cdot}$  dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire ( $H_{\text{infla}}$ ), incubés avec du sérum ( $S_{\text{infla}}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*,  $p < 0,05$  comparé à  $H_{\text{infla}}$ ,  $n = 3$ ..... 114
- Figure 34. Concentration de  $\text{NO}^{\cdot}$  dans des hépatocytes procédant de lapins témoins ( $H_{\text{cont}}$ ), incubés avec de l'IL-6 et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.  $n = 3$  ..... 116
- Figure 35. Concentration de  $\text{NO}^{\cdot}$  dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire, incubés avec de l'IL-6 et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.  $n = 3$ ..... 117

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Ah : *aryl hydrocarbon*

AP-1 : protéine activatrice-1

BCA : acide bicinchoninique

CAR : *constitutive androstane receptor*

DCFH-DA : diacétate de 2',7' dichlorofluorescéine

DFB : *3,4-difluorobenzoyloxy-5,5-diméthyl-4-(4-méthylsulfonyl phényl)-(5H)-furan-2-one*

DFH: *3-hydroxy-4-(4-méthylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one*

DMTU: diméthylthiourée

DPI : diphényleneiodonium

DRO : dérivés radicalaires de l'oxygène

ERK: *extra cellular signal related protein kinase*

FAD: flavine adénine dinucléotide

FADH : flavine adénine dinucléotide (forme réduite)

FMN : flavine monucléotide

GSH: glutathion réduit

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxyde d'hydrogène

IL-1 $\beta$  : Interleukine 1  $\beta$

IL-6 : Interleukine 6

IFN- $\alpha$  : interféron  $\alpha$

IFN- $\gamma$  : interféron  $\gamma$

JAK: *Janus activated kinase*

JNK: *c-jun N-terminal kinase*

L-NAME : *N-nitro-L arginine methyl ester*

LPS : lipopolysaccharides

MAPK : *mitogen activated protein kinase*

MDA : malondialdéhyde

MROD: méthoxyresorufine

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF-1 : facteur nucléaire 1

NF- $\kappa$ B : facteur nucléaire-kappa B

NO: Monoxyde d'azote (*Nitric Oxide*)

NOS: synthase de monoxyde d'azote (*Nitric Oxide Synthase*)

O<sub>2</sub><sup>-</sup> : ion superoxyde

OH<sup>·</sup> : radical hydroxyle

ONOO<sup>-</sup>: ion peroxydinitrite

PAF: *Platelet Activating Factor*

PPAR: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*

PXR: *Pregnane X Receptor*

STAT: *signal transduction and activation of transcription*

SOD: superoxyde dismutase

TNF: facteur de nécrose tumorale

TRX: thiorédoxine

TTFA : Thényltrifluoroacétone

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tout d'abord mon directeur de recherche le Dr. Patrick du Souich qui m'a accueilli dans son laboratoire et dont la patience et la présence ont été constantes tout le long de ce projet. Je tiens également à remercier toute l'équipe du laboratoire: Lucie Héroux, Mariève Dupuis et Mélanie Gabriac ainsi que tous les anciens étudiants et stagiaires qui ont rendu mon expérience plus que plaisante. Merci pour la belle atmosphère, les tartes au sucre et les gâteaux froids, les fous rires, les chansons à la radio ('because of you') qui me motivaient à finir mon travail au plus vite et les encouragements quand les 'manips' ne marchaient pas (Orlando et moi n'oublieront pas!).

Cette maîtrise n'aurait pas été possible sans l'encouragement de ma famille : merci Papa et Maman de m'avoir transmis la foi et la persévérance dans le travail. Je vous aime et vous dédie ce travail. Merci à Jocelyn, Sandrine, Adèle et Éliane pour vos prières et votre soutien, vous êtes les meilleures sœurs au monde. Merci également à ma famille élargie: mon oncle Michel Yanou et sa famille, Daniel, Isabelle, Israël et la gang de l'église (désolé les filles vous êtes vraiment trop nombreuses pour être citées individuellement et je ne veux pas faire de jalouses. Sachez seulement que je vous aime toutes. Chacune d'entre vous d'une manière ou d'une autre aura contribué à la réalisation de ce projet et je vous en suis très reconnaissante).

Enfin, un dernier merci à toutes les autres connaissances et amis qui de près ou de loin m'ont encouragé, motivé et soutenu pendant cette maîtrise. Que Dieu vous bénisse tous!!!!

# **INTRODUCTION**

## **PARTIE I : LE CYTOCHROME P450**

Dans cette partie, nous passerons en revue les principales enzymes de la famille du cytochrome P450 humain. Nous discuterons de leur importance non seulement dans le métabolisme, mais aussi dans d'autres processus physiologiques et nous étudierons leur régulation.

### **I- Le métabolisme**

La plupart des médicaments sont éliminés du corps de deux façons: ils sont soit excrétés sans modification, soit métabolisés, c'est à dire biotransformés en d'autres composés. Ces composés peuvent être à leur tour éliminés ou métabolisés.

Le métabolisme implique généralement la conversion d'un composé lipophile et non polaire en un composé polaire et hydrophile qui pourra donc être plus facilement excrété par les systèmes rénal et biliaire. Traditionnellement, ces réactions sont classées en deux groupes :

Les réactions de phase I comprennent les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Un groupe fonctionnel, comme le groupe hydroxyle, est souvent rajouté à la molécule. Les produits de ces réactions sont souvent plus actifs que leurs précurseurs et peuvent même être toxiques dans certains cas. Le groupe fonctionnel peut servir de point d'attaque pour les réactions de phase II qui sont des réactions de conjugaison, où un substituant est attaché à la molécule via le site fonctionnel.

La majeure partie des réactions de biotransformation a lieu dans le foie. Le réticulum endoplasmique lisse du foie contient de nombreuses enzymes requises pour

catalyser ces réactions. Parmi ces enzymes appelées enzymes microsomaux, celles de la famille du cytochrome P450 sont sans doute les mieux étudiées.

Les enzymes de la famille du cytochrome P450 catalysent les réactions de phase I.

## **II - Historique du cytochrome P450**

C'est dans les années 50 qu'apparaissent les premières observations sur le cytochrome P450. A l'époque, des études avaient déjà établi plusieurs voies du métabolisme des xénobiotiques et la notion que le métabolisme impliquait des réactions biochimiques était déjà reconnue (Williams, 1959). Les chercheurs Jim et Elizabeth Miller avaient déjà démontré que les enzymes clés du métabolisme étaient situées dans certaines fractions du foie. En effet, en étudiant l'activation métabolique du carcinogène aminoazo *N-N*diméthyl-4-aminoazobenzène (*butter yellow*), ils notèrent que son métabolisme nécessitait de l'oxygène et qu'une certaine fraction d'homogénat de foie de rat (séparé par centrifugation) était capable de catalyser cette réaction (Mueller et Miller, 1949 et 1953).

Durant cette même période, Julius Axelrod en travaillant sur le métabolisme des médicaments psychoactifs montra que les microsomes de foie de lapin requéraient la présence du nucléotide triphosphopyridine réduit et de l'oxygène afin de maintenir le métabolisme (Axelrod, 1955).

Ryan et Engel démontrèrent que la triphosphopyridine, l'oxygène ainsi que la fraction microsomale du cortex adrénal bovin étaient également requis pour l'hydroxylation de la progestérone. Ils démontrèrent aussi que cette réaction était inhibée



par le monoxyde de carbone et renversée par la lumière (Ryan et Engel, 1957) mais le catalyste n'était pas encore découvert.

En 1955, Mason et coll. ainsi que Hayaishi et coll. démontrèrent que durant le métabolisme, l'oxygène est couplé à un substrat organique et que cette réaction est catalysée par des enzymes métallo-protéiques baptisées oxydases à fonction mixtes (*mixed function oxidases*). On sait aujourd'hui que la plupart de ces réactions sont catalysées par le cytochrome P450.

En 1954, Chance et Williams (Chance et Williams, 1954) avaient isolé une fraction mitochondriale et démontré que le surnageant contenait une hémoprotéine appelée cytochrome b5 qui pouvait être réduite par la NADPH. Martin Klingenberg entreprit d'élucider les mécanismes de la réduction du cytochrome b5 hépatique. C'est durant ces recherches qu'il observa la présence d'un pigment lié au monoxyde de carbone. Ce pigment avait un large spectre d'absorbance dont le maximum était de 450 nm d'où le nom P450 (Klingenberg, 1958).

Peu après, Sato et Omura démontrèrent que le pigment en question était une hémoprotéine qu'ils qualifièrent de cytochrome (Omura et Sato, 1962) et le cytochrome P450 fut plus tard établi comme l'oxygénase terminale dans les réactions d'hydroxylation des stéroïdes (Cooper, 1965).

### **III- Structure et mécanisme d'action du cytochrome P450**

Le spectre particulier du cytochrome P450 est dû à la présence d'un hème sur le site actif de la protéine. Les hèmes sont des groupes prosthétiques constitués d'un ion Fer situé au centre d'une molécule cyclique organique. L'ion Fer présente six sites de

liaison à des ligands. Quatre de ces sites sont occupés par des molécules d'azote sur l'hème, un autre est occupé par un ion thiolate provenant d'une cystéine située près du site, ce qui laisse un site de liaison libre sous le groupe cyclique. L'enzyme a la forme d'un triangle avec le groupe hème au centre (Fig.1).

En 1968, Coon et coll. furent les premiers à purifier et solubiliser l'enzyme. Ils découvrirent aussi que l'oxydation par le cytochrome P450 nécessite en fait trois composantes: le cytochrome P450, la cytochrome P450 réductase et un substrat hydrophobe (Lu et Coon, 1968 et 1969).

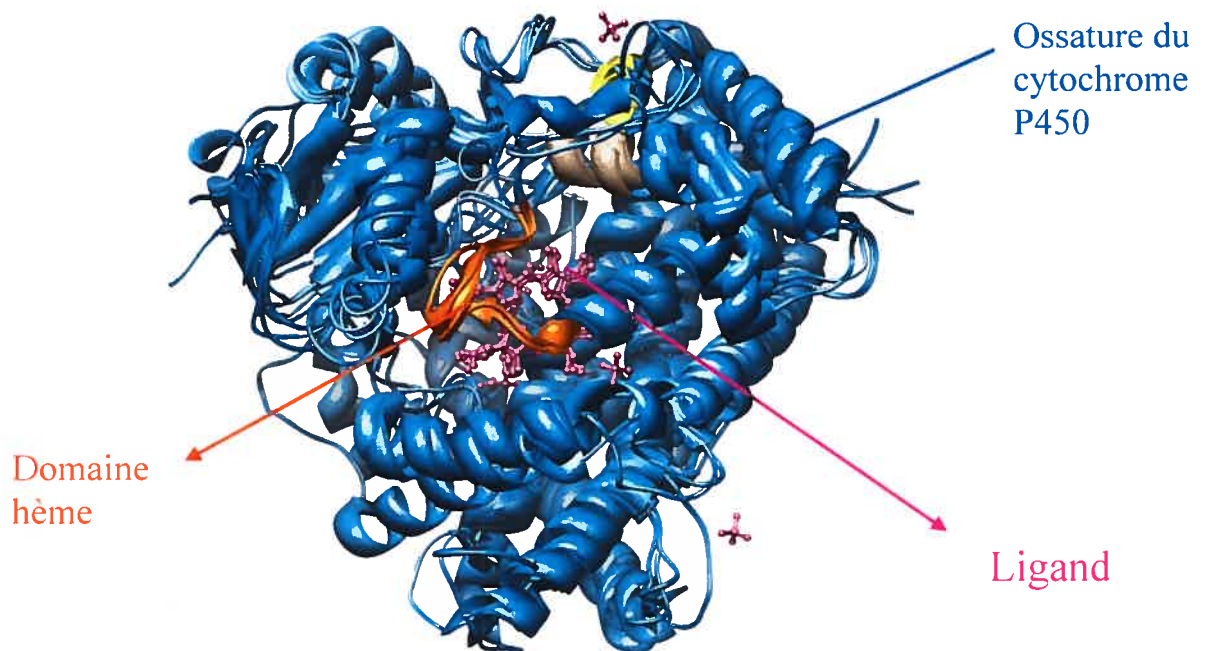
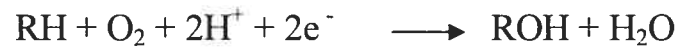


Figure 1. Structure du cytochrome P450, Source : [www.p450.kvl.dk/gallery/](http://www.p450.kvl.dk/gallery/).

L'oxydation par le cytochrome P450 se déroule lors d'un cycle catalytique complexe. En plus du cytochrome P450, cette réaction requiert la présence d'oxygène, de NADPH et d'un donneur d'électron qui peut être le cytochrome b5 ou plus généralement la flavoprotéine NADPH P450 réductase. La réaction peut se résumer à cette équation :



où le RH est un des substrats du P450. Ce cycle catalytique comprend en fait 7 étapes clés qui prennent environ 1 à 10 secondes (Fig.2).

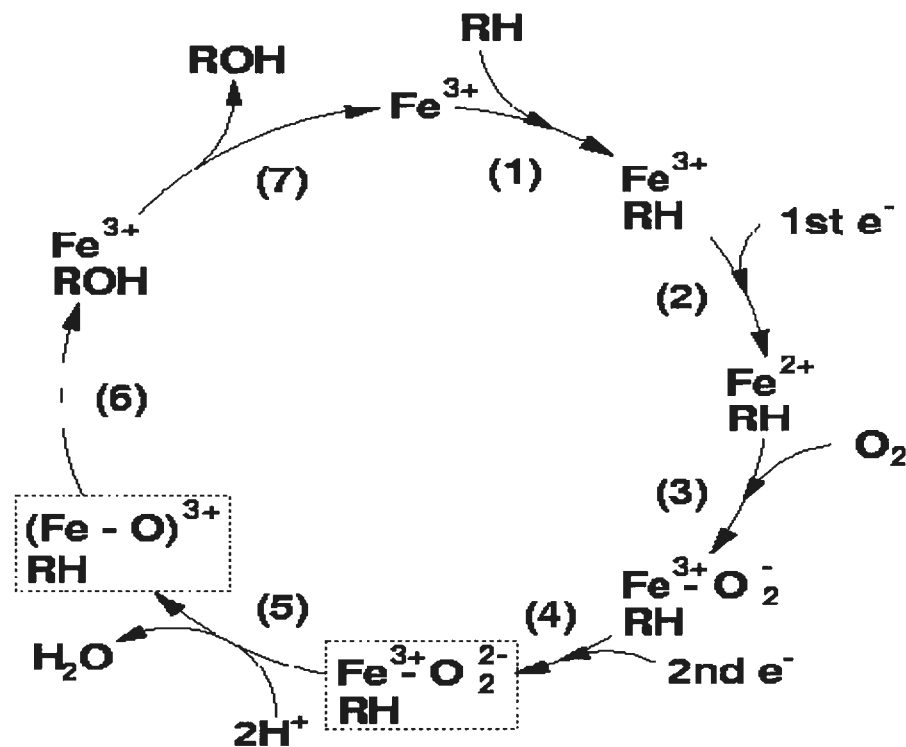


Figure 2. Cycle catalytique du cytochrome p450, Source : [www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/](http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/).

- 1) Le substrat se fixe au cytochrome P450 : soit sur une poche lipophile de l'hémoprotéine, soit directement sur le  $\text{Fe}^{3+}$  du hème.

- 2) A la suite de cette liaison, l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  reçoit un électron de la NADPH P450 réductase et est réduit à  $\text{Fe}^{2+}$ . La NADPH réductase présente dans le réticulum endoplasmique 'prend' 2 électrons à la molécule de NADPH. Ces électrons vont réduire deux flavines, la FAD puis le FMN qui sont situées dans des domaines séparés de la NADPH réductase. Le FMN transfère alors son électron au  $\text{Fe}^{3+}$  du groupe prosthétique hème.
- 3) L'ion  $\text{Fe}^{2+}$  va alors se lier à une molécule d'oxygène, pour former un complexe  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ . Ce complexe n'est pas très stable et peut facilement s'oxyder relâchant de l'ion superoxide. Le complexe devient alors  $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^-$ . Mais s'il y a une deuxième réduction, le cycle catalytique continue.
- 4) Une deuxième réduction prend place avec un électron provenant du cytochrome b5 et la protéine forme maintenant le complexe  $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH-substrat}$ .
- 5) Ce complexe va réagir avec deux protons provenant du milieu ambiant qui vont casser le lien O-O et former deux entités séparées : le complexe  $(\text{Fe-O})^{3+}\text{-substrat}$  et du  $\text{H}_2\text{O}$
- 6) L'oxygène ferreux va alors se lier à l'atome d'hydrogène du substrat ce qui va entraîner la formation d'un ion hydroxyle et donc l'hydroxylation du substrat.
- 7) Par la suite, le substrat oxydé se dissocie du  $\text{Fe}^{3+}$  et l'enzyme P450 est régénérée.

#### **IV- Isoformes du cytochrome P450**

Dans les années 60, on remarquait que certains inducteurs comme le phénobarbital et le 3-méthylcholanthrène affectaient de manière spécifique le métabolisme de certains produits et semblaient même altérer le spectre d'absorbance du cytochrome, ce qui mena à l'hypothèse qu'il existait plusieurs isoformes du cytochrome P450 (Imai and Sato, 1966; Sladek and Mannering, 1966). En 1975, des expériences de purifications de protéines montrèrent qu'il existait au moins quatre isoformes du cytochrome P450 (Haugen et coll., 1975). Cette découverte fut suivie plus tard par l'isolation des isoformes aujourd'hui appelés CYP1A2 et CYP2B4 (Haugen et Coon, 1976).

À ce jour, plus de 750 isoformes ont été séquencés dont 55 chez l'humain. Les multiples enzymes sont classées en familles, en sous-familles et en isoformes.

Les isoformes ayant une homologie séquentielle de 40 % et plus sont considérés comme appartenant à la même famille, tandis que ceux ayant une homologie supérieure à 55 % sont regroupés dans la même sous-famille. La famille du cytochrome P450 est représentée dans une multitude d'organismes aussi bien chez les plantes et les mammifères que chez les bactéries.

Chez les humains, bien qu'étant représentés dans plusieurs tissus dont l'œil ou la peau, les isoformes du P450 se retrouvent en plus grande concentration dans le réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes du foie. On les retrouve aussi en quantités moindres mais certainement pas négligeables dans l'intestin, les poumons, les reins et le cerveau. Le métabolisme des xénobiotiques implique principalement 3 familles du cytochrome P450 humain : les familles CYP1, CYP2 et CYP3.

## **1- La famille CYP1**

Chez l'humain, les isoformes les plus importants de cette famille sont le CYP1A1 le CYP1A2 et le CYP1B1. Le CYP1A1 est majoritairement exprimé dans les tissus extra-hépatiques. Dans le foie, il est seulement exprimé en présence d'inducteurs. Le CYP1A1 et le CYP1B1 métabolisent principalement les hydrocarbures aromatiques polycycliques qu'on retrouve notamment dans la fumée de cigarette ou dans les produits d'incinération industrielle. Le CYP1A2 quant à lui, métabolise les arylamines telles que les N-hétérocycliques (Nebert et Russell, 2002). Le CYP1A2 est exprimé principalement dans le foie et représente environ 12% du cytochrome P450 présent dans le foie humain (Shimada et coll., 1994). Cette enzyme est responsable du métabolisme de la caféine et de la théophylline et joue aussi un rôle dans le métabolisme d'antipsychotiques et d'antidépresseurs comme la clozapine et l'imipramine.

Les enzymes CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1 sont fréquemment impliquées dans la biotransformation et l'activation métabolique des cancérigènes.

## **2- La famille CYP2**

Le CYP2A6, le CYP2B6, la sous-famille des CYP2C, le CYP2D6 et le CYP2E1 sont des enzymes importantes pour le métabolisme des xénobiotiques chez l'humain (Nebert et Russell, 2002). Le CYP2A6 ne représente que 4% des cytochromes P450 humain, il est surtout connu pour son implication dans le métabolisme de la nicotine (Venkatakrisnan et coll., 2001). Le CYP2B6 contribue au métabolisme de la cyclophosphamide et du propofol. Son expression varie largement d'individu à individu. Cette enzyme peut être inhibée par les antidépresseurs de la classe des inhibiteurs

sélectifs de la capture de sérotonine (SSRI) comme la fluvoxamine. Le CYP2D6 représente seulement 1.5% des isoformes du cytochrome P450 mais métabolise à lui seul 75 médicaments. Il s'agit de médicaments antihypertenseurs comme le métoprolol, d'antiarythmiques comme la flécaïnide, d'analgésiques comme la codéine ou d'antidépresseurs comme la désipramine. Le CYP2D6 est très polymorphique avec cinquante allèles identifiés (Venkatakrisnan et coll., 2001). Le CYP2E1 représente 6.6% du cytochrome P450 (Shimada et coll., 1994) et est impliqué dans le métabolisme du paracétamol et de l'éthanol (Venkatakrisnan et coll., 2001).

Les enzymes de la famille du CYP2C sont les plus importantes après celles du CYP3A et représentent 18% des isoformes chez les humains (Shimada et coll., 1994). Les isoformes de cette famille sont le CYP2C8, le CYP2C9, le CYP2C18 et le CYP2C19. Le CYP2C8 catalyse le métabolisme du taxol, un agent anticancéreux. Le CYP2C9 est responsable du métabolisme de la warfarine, un anticoagulant, du célécoxib un anti-inflammatoire, de la phénytoïne un anticonvulsif (Venkatakrisnan et coll., 2001). Le CYP2C9 est également très polymorphique. La plupart des substrats du CYP2C9 sont aussi métabolisés par le CYP2C19 à cause de la grande homologie entre ces protéines. Le CYP2C18 est très peu exprimé dans le foie humain et son importance clinique n'a pas été démontrée (Venkatakrisnan et coll., 2001).

### **3- La famille CYP3**

Les quatre enzymes de la famille 3A (le CYP3A4, le CYP3A5, le CYP3A7 et le CYP3A43) sont les plus abondantes dans le foie et l'intestin, représentant environ 29% des cytochromes P450 humains (Shimada et coll., 1994). Environ 50% des médicaments

sur le marché sont transformés par ces enzymes. Le CYP3A4 est l'isoforme métabolisant le plus de médicaments et est exprimé partout dans le foie et dans l'intestin. Le CYP3A5 est exprimé de manière polymorphique dans 20% de la population tandis que le CYP3A7 est seulement exprimé chez le fœtus (Maurel, 1996). Le CYP3A43 a été récemment découvert et son importance clinique est à établir (Venkatakrishnan et coll., 2001).

Beaucoup d'isoformes du cytochrome P450 sont polymorphiques chez les humains et sont souvent inhibés ou induits par un grand nombre d'agent thérapeutiques ce qui peut poser des problèmes d'interaction médicamenteuse et/ou d'autres conséquences cliniques.

## **V- Rôle physiologique**

Les avancées en biochimie ont permis de mieux caractériser les fonctions biochimiques des isoformes et ont permis de découvrir que leur rôle dépassait de loin le métabolisme des xénobiotiques dans le foie. Les xénobiotiques incluent toutes les molécules étrangères au corps comme les médicaments, les métabolites, la nourriture et les polluants environnementaux comme les herbicides et les pesticides.

On sait maintenant que les enzymes de la famille du cytochrome P450 sont aussi responsables du métabolisme et de la synthèse de plusieurs substances endogènes.

### **1- Métabolisme du cholestérol et synthèse de la bile**

Le cholestérol est une molécule de grande importance dont le rôle est de maintenir la structure de la membrane cellulaire. C'est également un précurseur de la synthèse des hormones stéroïdiennes et à la synthèse des acides biliaires. La synthèse d'acides biliaires



à partir du cholestérol est la voie principale de biotransformation du cholestérol chez les mammifères (Nebert et Russell, 2002).

Le cholestérol est synthétisé à partir d'acétyl-CoA via la formation de composés intermédiaires. Le cytochrome CYP51A1 également appelé *lanostérol 14 $\alpha$ -desmethylase* catalyse plusieurs réactions d'oxydation conduisant à la synthèse de cholestérol à partir d'un précurseur, le lanostérol.

L'hydroxylation des structures cycliques de la molécule de cholestérol et l'oxydation d'une de ses chaînes latérales résulte en la formation de sels biliaires. Ces réactions sont catalysées en partie par six isoformes du cytochrome P450 : les isoformes CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1, CYP8B1, CYP27A1 et CYP46A1 (Nebert et Russell, 2002).

## **2- Synthèse et métabolisme des stéroïdes**

Les hormones stéroïdiennes sont synthétisées dans les cellules stéroïdogéniques de la glande surrénale, des ovaires, des testicules, du placenta et du cerveau. Elles sont nécessaires pour le bon fonctionnement du système reproducteur aussi bien chez l'homme que chez la femme, ainsi que pour le maintien de l'homéostasie dans le corps (Manna et Stocco, 2005). Les isoformes mitochondriaux CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2 ainsi que les isoformes CYP17A1, CYP19A1 et CYP21A2 jouent un rôle essentiel lors de leur synthèse.

Les hormones stéroïdiennes sont synthétisées à partir du cholestérol et leur synthèse implique la formation de plusieurs précurseurs et composés intermédiaires. La première étape (et l'étape limitante) de la stéroïdogénèse est la formation de

prégnénolone à partir de cholestérol. La prégnénolone sert de précurseur à la formation de toutes les hormones stéroïdiennes. Elle est synthétisée lorsque l'enzyme CYP11A1 segmente une partie de la molécule de cholestérol la convertissant en prégnénolone.

Le CYP17A1 est nécessaire à la synthèse du cortisol, de la testostérone et de l'estrogène. Cette enzyme catalyse l'hydroxylation au site 17 $\alpha$  et l'oxydation d'hormones précurseurs. Le CYP19A1 catalyse la formation d'oestriol et d'oestradiol en aromatisant les précurseurs androgènes de ces molécules, l'androstènedione et la testostérone. L'enzyme CYP11B2 catalyse la synthèse de la corticostérone tandis que la CYP11B1 catalyse la formation de cortisol et de corticostérone par des réactions d'hydroxylation. Enfin, l'enzyme CYP21A2 va catalyser l'hydroxylation de plusieurs précurseurs stéroïdiens jouant ainsi un rôle incontournable dans la synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes (Nebert et Russell, 2002).

### **3- Métabolisme de l'acide arachidonique et des eicosanoïdes**

L'acide arachidonique est un acide gras qui à travers son métabolisme sert de précurseur à plusieurs substances dont les prostaglandines et les leucotriènes. Ces molécules servent de médiateurs dans la signalisation cellulaire et sont impliquées dans divers processus physiologiques tels que la bronchodilatation, la bronchoconstriction, la vasodilatation, la vasoconstriction, la formation d'œdèmes, l'inflammation liée à la réponse allergique, le chimiotactisme, l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et leur dispersion, l'induction de fièvre, la modulation du transport ionique, la mobilisation du calcium intracellulaire, la modulation des ATPasesNa/K, la formation des ovules, la sécrétion de peptide et la réponse à la douleur. Toutes ces molécules sont couramment

regroupées sous le nom d'eicosanoïdes (Funk, 2001). Plusieurs enzymes des familles CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP5 et CYP8 participent à la synthèse et au métabolisme des eicosanoïdes via des réactions d'époxidation de réduction et d'oxydation. Par exemple, l'enzyme CYP5A1 catalyse la synthèse de la thromboxane A<sub>2</sub>, un acide gras qui stimule l'agrégation des plaquettes et produit une vasoconstriction (Nebert et Russell, 2002). L'enzyme CYP8A1 catalyse la synthèse de prostacycline qui inhibe l'agrégation des plaquettes et produit une vasodilatation.

#### **4- Synthèse et métabolisme de la vitamine D3**

La vitamine D est une hormone stéroïdienne qui, via sa liaison au récepteur nucléaire VDR, va réguler les niveaux de calcium et de phosphore dans le corps ainsi que la minéralisation des os. L'enzyme mitochondriale CYP27A1 qui est aussi impliquée dans la synthèse de l'acide biliaire, est une des enzymes responsables de la synthèse de vitamine D<sub>3</sub> (la forme humaine) à partir d'un précurseur, le colescalciférol (Wikvall, 2001). La molécule peut devenir active suite à l'hydroxylation de son carbone 1 $\alpha$  par l'enzyme CYP27B1. Enfin, la vitamine D est catabolisée principalement par l'enzyme CYP24A1 grâce à une hydroxylation au carbone 24 qui empêche la molécule de se lier à son récepteur (Nebert et Russell, 2002).

#### **5- Hydroxylation de l'acide rétinoïque**

L'acide rétinoïque est le principal dérivé biologiquement actif de la vitamine A. Cette molécule est impliquée dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la segmentation et le développement des axes du corps durant l'embryogenèse, la formation

des membres et celle des muscles du squelette. (Dubrulle et Pourquié, 2004). Un manque ou un excès d'acide rétinoïque a d'ailleurs pour conséquence de graves malformations. L'acide rétinoïque contrôle également la prolifération et la différenciation cellulaire ce qui en fait une cible importante dans le traitement du cancer (Lotan, 1996; Lefebvre et coll., 2005). Trois enzymes de la famille CYP26 sont impliquées dans l'hydroxylation de l'acide rétinoïque. Il s'agit des CYP26A1, 26B1 et 26C1. En l'hydroxylant, ces trois enzymes peuvent dégrader l'acide rétinoïque bloquant ainsi les différentes voies de signalisation impliquant cette protéine.

#### **6- Production de monoxyde d'azote (NO)**

Les isoformes CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6 peuvent biotransformer la sérotonine en hydroxylamine qui est ensuite converti en monoxyde d'azote (NO), un gaz aux propriétés vasodilatatrices, en présence de catalase (Fradette et coll., 2004).

#### **7- Fonctions inconnues**

Il existe plusieurs isoformes du cytochrome P450 qui ont été identifiés et séquencés mais dont les fonctions restent inconnues chez les humains. Il s'agit des enzymes CYP20A1, CYP27C1, CYP4A20, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP26B1 et CYP26C1. On spécule que ces enzymes ont un rôle limité à certains tissus ou cellules ou alors à certaines étapes particulières de l'embryogenèse (Nebert et Russell, 2002).

## **VI- Facteurs influençant l'expression et l'activité du cytochrome P450**

L'expression du cytochrome P450 est régulée par des facteurs endogènes tels que les polymorphismes génétiques, la régulation hormonale ou les changements physiologiques ainsi que par des facteurs exogènes tels que la diète, les xénobiotiques, la consommation d'alcool ou de cigarettes et les pathologies.

### **1- Polymorphismes génétiques**

Dans les familles 1, 2 et 3 du cytochrome P450, pratiquement tous les gènes sont polymorphiques à l'exception des gènes *CYP1A1* et *CYP2E1* (Ingelman-Sundberg, 2002). Les mutations dans les gènes encodant les isoformes du cytochrome P450, peuvent entraîner une diminution de l'activité de l'enzyme. Par exemple, pour l'enzyme CYP2D6, la mutation CYP2D6\*17 dans le site de reconnaissance du substrat entraîne un changement dans la spécificité au substrat, ce qui se traduit par une diminution de l'activité (Oscarson et coll., 1997). Les mutations peuvent également entraîner une augmentation de l'activité comme c'est le cas pour les mutations du CYP2A6 où les sujets détiennent plusieurs copies du gène (Rao et coll., 2000). Enfin, l'activité peut même être abolie. Les mutations avec les répercussions cliniques les plus importantes sont celles affectant les gènes encodant les enzymes du CYP2C9, CYP2C19 et CYP2D6.

### **2- Physiologie**

Chez les humains, contrairement à d'autres espèces comme le rat, les observations sur les variations des cytochromes dues à l'âge et au genre sont peu concluantes et souvent contradictoires. Des études effectuées sur des microsomes de foie humain indiquent une

activité du CYP1A2 plus importante chez les hommes que chez les femmes, une observation confirmée par certaines études cliniques (Parkinson et coll., 2004). Par contre, des études *in vivo* réalisées chez les humains ne trouvent pas de différences significatives dans les niveaux de CYP1A2 entre les hommes et les femmes (Bebia et coll., 2004). Dans des hépatocytes humains, des études *in vitro* révèlent une activité du CYP3A4 plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Parkinson, 2004), mais les études *in vivo* ne détectent pas de différences (Bebia et coll., 2004)

Par ailleurs, des études dans des hépatocytes humains isolés ne démontrent pas de variations significatives dans l'activité des CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, CYP2E1 et CYP2C11 en fonction de l'âge. Par contre, il est noté que dans des microsomes humains, les activités du CYP1A2, du CYP2D6, du CYP2B6, du CYP2E1 et du CYP2C19 ont tendance à diminuer d'au moins 25% avec l'âge, tandis que celles du CYP2A6 et du CYP4A11 ont tendance à augmenter d'au moins 25% (Parkinson, 2004). Les études *in vivo* quant à elles notent une corrélation négative significative entre l'âge et l'activité pour le CYP2C19, mais une corrélation positive pour le CYP2E1 (Bebia et coll., 2004).

Des différences de métabolisme entre groupes ethniques ont également été identifiées. 7% des caucasiens et seulement 1% des orientaux sont des métaboliseurs lents de la débrisoquine, car le principal allèle du CYP2D6 responsable du changement de métabolisme ne se retrouve pratiquement pas dans ces populations. Par ailleurs, le diazépam est métabolisé par le CYP2C9 et l'on retrouve plus d'allèles mutants de cette enzyme chez les orientaux : par conséquent, ces derniers métabolisent plus lentement le diazépam (Bertilsson, 1995).

### 3- Spécificité tissulaire

Certains isoformes, comme le CYP51, se retrouvent partout dans le corps humain (Strömstedt et coll., 1996). D'autres sont exprimés seulement dans certains tissus. Ainsi l'ARN messager du CYP2F1 et du CYP4B1 est détecté dans les poumons et pas dans le foie. De même les isoformes CYP11A, CYP11B1 et CYP11B2 se retrouvent surtout dans la glande surrénale (Nishimura et coll., 2003). Le CYP1A2 et le CYP2E1 ne se retrouvent pas dans l'intestin humain mais la quantité du CYP2C et de CYP2D6 y est 100 à 200 fois plus grande que dans le foie (Lin et Lu, 2001)

### 4- Nutrition

Le contenu de la diète peut moduler l'activité des enzymes du cytochrome P450. Ceci peut être dû aux composantes même de la diète, à des additifs, à des xénobiotiques présents dans la nourriture, à des contaminants ou à des composés générés pendant la cuisson. Par exemple, les choux de Bruxelles, les choux-fleurs et le chou contiennent des inducteurs du récepteur Ah (*aryl hydrocarbon hydroxylase*) qui module l'activité de certains isoformes du cytochrome P450 (Loub et coll, 1975). Le jus de pamplemousse et tous les produits contenant des furano-coumarins inhibent les enzymes de la sous-famille CYP3A et de ce fait peuvent être à l'origine d'interactions médicamenteuses (Greeblatt, 2001). L'extrait d'orange amer qu'on retrouve dans les oranges sanguines et dans des suppléments galéniques, a le même effet que le jus de pamplemousse (McCabe, 2004).

## **5- Xénobiotiques, alcool et cigarettes**

Plusieurs substances étrangères en plus d'être des substrats du cytochrome P450 sont aussi des inhibiteurs ou des inducteurs de ces enzymes. Cette modulation a un impact important sur le métabolisme des xénobiotiques, sur la pharmacocinétique, sur les interactions médicamenteuses, sur la toxicité et les caractéristiques cancérigènes des substances étrangères.

Par exemple, le phénobarbital et d'autres barbituriques induisent le cytochrome P450. Le phénobarbital est le prototype d'un large groupe de xénobiotiques qui induisent le cytochrome P450 de manière similaire. Ces 'PB-like inducers' sont entre autres des médicaments comme les barbituriques, la phénytoïne ou la cyclophosphamide, des pesticides ou des solvants comme l'acétone (Czekaj, 2000). La dexaméthasone et la rifampicine peuvent aussi induire le CYP3A par un mécanisme différent.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques contenus dans la cigarette peuvent induire le cytochrome P450 hépatique et extra-hépatique comme le CYP1A1 le CYP1A2 et le CYP2E1. Dans des études animales, la nicotine induit les enzymes CYP1A1/2A2, CYP2B1/2B2 et CYP2E1 (Zevin et Benowitz, 1999)

L'éthanol est un autre inducteur du métabolisme hépatique. Il affecte en particulier le CYP2E1.



## 6- Pathologies

Il a été démontré que de multiples états pathologiques peuvent altérer l'expression et l'activité du cytochrome P450 entre autres le diabète, l'obésité, l'insuffisance rénale les infections et les inflammations (Tableau.1). La plupart de ces observations ont été faites au niveau du cytochrome P450 hépatique (Cheng et Morgan, 2001).

Pathologie	Enzymes impliquées	Nature du changement	Références
Diabète	CYP1A2	Augmentation de l'activité liée au diabète de type I	Cheng et Morgan, 2001
Obésité	CYP3A4, CYP2E1	Activité du 3A4 réduite de 10-35%; augmentation de l'activité du 2E1	Kotlyar et Carson, 1999
Cirrhose hépatique	CYP3A, CYP2C, CYP2E1, CYP1A2	Niveau de protéines diminué de 20-80% (limité aux cas sévères)	Farrell, 1999
<b>CAS D'INFECTIONS ET D'INFLAMMATION</b>			
Influenza	CYP1A2	Diminution de la clairance de la théophylline, un substrat du CYP1A2	Kraemer et coll., 1982
Infections adénovirales	CYP1A2	Diminution de la clairance de la théophylline,	Chang et coll., 1978
Malaria	CYP3A4	Diminution du métabolisme de la quinine, un substrat du CYP3A4	Trenholme et coll., 1976
Cancer	CYP3A	Diminution de l'activité du CYP3A chez des patients atteints de cancer à un stade avancé	Rivory et coll., 2002

Tableau 1. Exemples de pathologies chez l'humain où les isoformes du P450 sont modifiés

## VII- Mécanismes de régulation

### 1- Mécanismes d'induction

L'induction du cytochrome P450 est généralement d'origine transcriptionnelle. Dans ce cas, l'inducteur (le composé augmentant la quantité d'enzymes) active un récepteur, ce qui va conduire à une modulation de la transcription de l'enzyme. Traditionnellement les inducteurs de P450 étaient divisés en deux classes d'inducteurs : les inducteurs qui agissaient comme le phénobarbital et ceux qui agissaient comme la dexaméthasone. On sait maintenant que la majorité des gènes dans les familles 1 à 4 du cytochrome P450 peuvent être induits à travers quatre mécanismes dépendants de récepteurs: le récepteur Ah et les récepteurs nucléaires CAR, PXR et PPAR.

#### 1.1 Le récepteur Ah

Le récepteur d'hydrocarbures aryles est une protéine cytosolique appartenant à la famille des facteurs de transcription PAS qui stimule la transcription des gènes de la famille CYP1. Lors de la liaison à un ligand (en général, un hydrocarbure aromatique) dans le cytosol, le récepteur est activé et délocalisé vers le noyau où il va s'hétérodimériser avec un facteur nucléaire le Arnt (*Ah receptor nuclear translocator*). Ce complexe va se lier à des éléments de réponse sur l'ADN en amont du gène *CYP1A1* et va stimuler la transcription du gène cible. Le récepteur Ah régule aussi d'autres gènes impliqués dans le métabolisme qui ont les mêmes éléments de réponse sur leur ADN. Un de ces gènes est le gène encodant l'enzyme de phase II, UDP-glucuronosyltransférase 1A1 qui catalyse la glucuronidation de la bilirubine (Dickins, 2004; Yueh et coll., 2005).

## 1.2 Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont en fait des facteurs de transcription qui possèdent un site de liaison au ligand par lequel ils sont activés et un site de liaison à l'ADN par lequel ils induisent la transcription. Les trois récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation des CYP hétérodimérisent avec le récepteur rétinoïde X (RXR) après leur activation et se lient à leur élément de réponse sur les gènes encodant les CYP2B, CYP3A et CYP4A (Figure 3). Ces récepteurs ne sont pas seulement responsables de la régulation des enzymes de la famille du cytochrome P450, mais aussi de la régulation d'autres enzymes métaboliques (Dickins, 2004). Ainsi, le PXR régule également l'expression de la sulfotransférase SULT2A1, une enzyme de phase II (Seo et coll., 2006).

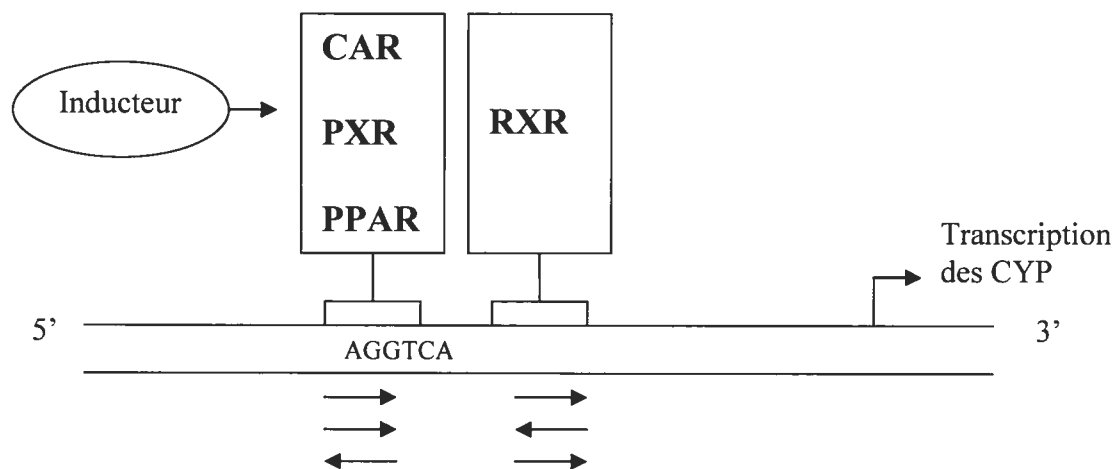


Figure 3. Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires lors de la régulation du cytochrome P450. L'hétérodimère formé par le récepteur et le RXR va lier des éléments de réponse sur l'ADN sur la séquence AGGTCA. Les éléments de réponse sont souvent des répétitions imparfaites de la séquence AGGTCA

*Le récepteur Pregnane X (PXR)*

Ce récepteur peut être activé par des stéroïdes ou par des xénobiotiques comme la rifampicine, la nifépidine et le ritonavir. Il est impliqué dans la régulation des isoformes de la famille du CYP3A. L'ARN messager du PXR est exprimé principalement dans le foie mais aussi dans le tube gastro-intestinal.

*Le récepteur constitutif de l'androstane (CAR)*

Le récepteur CAR est responsable de l'induction du CYP2B par le phénobarbital. Le CAR est localisé dans le cytosol et relocalisé vers le noyau après activation par l'inducteur et après avoir été déphosphorylé. Il existe cependant une activité constitutive qui est indépendante du ligand. Une fois dans le noyau, le récepteur CAR se lie à son élément de réponse sur l'ADN conjointement avec le récepteur RXR avec lequel il forme un hétérodimère (Figure 4).

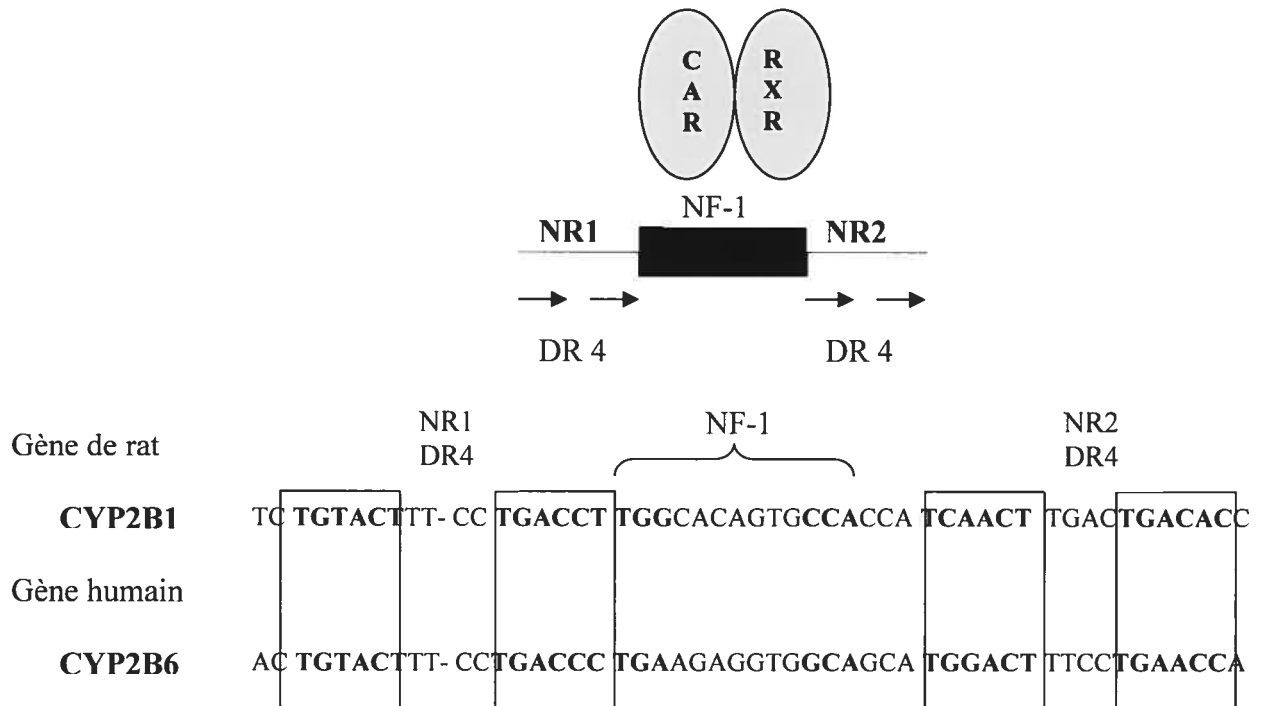


Figure 4. Élément de réponse au phénobarbital sur les gènes de la famille CYP2B: les gènes contiennent des sites de liaison au récepteur nucléaire (NR1 et NR2) entourant un site de liaison à un facteur de transcription (NF-1). Chaque site de liaison est constitué de 2 répétitions directes espacées par 4 bases (DR4).

### *Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxisomes (PPAR)*

Ce récepteur est exprimé dans le cœur, les reins et le foie. Il est souvent activé par les médicaments servant à diminuer la quantité de lipides comme les fibrates. Le PPAR est surtout induit chez les rongeurs où son activation résulte en une prolifération des peroxisomes et à une induction de certains gènes du CYP4A. Chez les humains, les ligands du PPAR ont des effets minimales sur le CYP4A mais ils peuvent induire le CYP2B et possiblement le CYP3A4 (Dickins, 2004).

### *Le récepteur RXR et la réactivité croisée des récepteurs nucléaires*

Le récepteur RXR forme des hétérodimères avec les autres récepteurs nucléaires modulant le cytochrome P450. Il peut également se fixer à l'ADN en tant qu'homodimère. L'expression du RXR est donc essentielle pour la régulation des isoformes du cytochrome P450. Chez les souris n'exprimant pas de RXR, l'expression basale des gènes régulés par le CAR, le PXR et le PPAR est diminuée (Wan et coll., 2000). De plus, les récepteurs CAR et PXR possèdent des éléments de réponse communs permettant ainsi une induction plus efficace des gènes qui possèdent ces éléments (Dickins, 2004).

### 1.3 Mécanismes non-transcriptionnels

Certaines enzymes ne sont pas régulées en augmentant la transcription. Par exemple, l'activation du CYP2E1 par l'éthanol est principalement due à une augmentation de la stabilité de l'ARN messager et de la protéine qui sont dégradés plus lentement (Ramana et Kohli, 1998).

## 2- Mécanismes d'inhibition

Les mécanismes d'inhibition du cytochrome P450 peuvent être divisés en 3 catégories : l'inhibition réversible, l'inhibition quasi-irréversible et l'inhibition irréversible. Les étapes 1, 3 et 6 du cycle catalytique du cytochrome P450 sont particulièrement vulnérables aux inhibitions. Les inhibiteurs réversibles agissent probablement au niveau de la première étape du cycle catalytique tandis que les inhibiteurs qui agissent plus tard sont souvent irréversibles ou quasi-irréversibles (Lin et Lu, 1998).

### 2.1 Inhibition réversible

Il s'agit probablement du mécanisme d'inhibition le plus commun pour les enzymes du cytochrome P450 par les xénobiotiques. L'inhibition réversible est temporaire et disparaît une fois que l'inhibiteur est éliminé. Les inhibiteurs réversibles agissent de manière dose dépendante (Lin et Lu, 2001) et peuvent être classés en deux catégories : les inhibiteurs compétitifs et les inhibiteurs non compétitifs. Lors de l'inhibition compétitive, l'inhibiteur se lie sur le site catalytique de l'enzyme c'est-à-dire sur le Fer du groupe prosthétique hème empêchant ainsi le substrat de se lier à l'enzyme. Il existe également un autre type de compétition où l'inhibiteur ne se lie pas à l'enzyme libre, mais au complexe formé par le substrat et l'enzyme. Dans ce cas également, le nouveau complexe substrat-enzyme-inhibiteur n'a pas d'activité (Lin et Lu, 2001). Par contre, lors de l'inhibition non compétitive, l'inhibiteur se lie sur un site autre que le site catalytique (dans la poche lipophile de la protéine). Le substrat est alors libre de se lier à l'enzyme mais le complexe substrat-enzyme-inhibiteur n'a pas d'activité. Beaucoup d'inhibiteurs

sont des médicaments contenant un atome d'azote qui peut interagir avec l'ion ferrique, comme les pyridines, les imidazoles et les quinoléines. L'efficacité de l'inhibiteur est donc déterminée par sa lipophilicité et par son affinité avec l'ion Fer du groupe prosthétique. Ainsi, le kétoconazole et la cimétidine interagissent avec l'ion ferrique mais la cimétidine est un inhibiteur plus faible de par sa faible lipophilicité.

## 2.2 Inhibition quasi-irréversible

Les inhibitions quasi-irréversibles, tout comme les inhibitions irréversibles, sont dues à la formation de métabolites réactifs. Elles nécessitent donc au moins un cycle catalytique de l'enzyme. L'inhibition quasi-irréversible implique la formation de liens non covalents entre les métabolites réactifs et le groupe prosthétique hème de l'enzyme. Le complexe formé, appelé complexe métabolique intermédiaire, empêche virtuellement toute activité de l'enzyme.

Ce genre d'inhibition est réversible *in vitro* en incubant les hépatocytes avec des molécules hautement lipophiliques qui vont déplacer le complexe métabolique du site catalytique. Par contre, *in vivo*, le complexe est tellement stable que l'activité ne peut être restaurée que par la synthèse de nouvelles protéines. Les alkylamines, les hydrazines et les antibiotiques macrolides comme l'érythromycine sont aux nombres des molécules qui causent une inhibition quasi-irréversible du cytochrome P450 (Lin et Lu, 1998).

## 2.3 Inhibition irréversible

Dans certains cas les métabolites réactifs inactivent de manière irréversible le cytochrome P450. Ce type d'inhibition est aussi appelé inactivation basée sur le



mécanisme (*mechanism based inactivation*). L'inhibition est due à une dégradation du groupe prosthétique hème et/ou à une dégradation de la protéine. La dégradation de la protéine entraîne une inactivation irréversible seulement si les acides aminés touchés sont essentiels au cycle catalytique de l'enzyme (Ortiz de Montellano, 1988).

La dégradation de l'hème s'effectue lorsqu'une molécule est oxydée par le CYP et forme un métabolite réactif qui va alkyler le groupe prosthétique hème du P450 et en conséquence va inactiver l'enzyme. Les médicaments de la classe des oléfines et des acétylènes vont alkyler la protéine et l'inactiver de manière irréversible.

## **PARTIE II : LA RÉGULATION DU CYTOCHROME P450 LORS DE L'INFLAMMATION**

Plusieurs des pathologies qui modulent l'expression et l'activité du cytochrome P450 ont une composante inflammatoire. Dans cette partie, nous examinerons ce qu'est l'inflammation ainsi que les médiateurs de la réaction inflammatoire susceptibles de moduler le cytochrome P450. Nous examinerons également les mécanismes par lesquels ces différents médiateurs peuvent moduler l'expression et l'activité du cytochrome P450.

### **I- L'inflammation**

#### **1- Définition**

Le corps fait face tous les jours à une multitude d'agents étrangers tels que les antigènes, les virus ou les bactéries. L'inflammation est une des premières réponses de défense du système immunitaire lors d'un dommage ou d'une infection.

L'inflammation est couramment définie comme la réponse d'un tissu à un dommage. Elle implique plusieurs réactions complexes déclenchées après des dommages aussi différents que les brûlures, les infections, les traumatismes, les tumeurs ou les maladies auto-immunes (Renton 2001). Les quatre indicateurs, utilisés depuis l'antiquité pour caractériser l'inflammation, sont : la rougeur, la chaleur, la douleur et l'œdème. Certains y ajoutent la perte de fonction. La réponse inflammatoire n'est pas spécifique et contrairement à la réponse immunitaire elle n'a pas de mémoire. La réaction est identique dans toutes les situations, et son but est de localiser et d'inactiver la source du dommage, de contenir et d'isoler les agents potentiellement dangereux, de déclencher et d'amplifier

la réponse immunitaire et de permettre la réparation des tissus endommagés (Rankin 2004).

Lorsqu'un tissu est endommagé, la première réaction est la réponse vasculaire. Le but de celle-ci est de faciliter l'arrivée des substances nécessaires à la défense de l'organisme jusqu'au site endommagé. Pour cela, le stimulus inflammatoire est généralement suivi d'une dilatation des vaisseaux sanguins permettant une augmentation du flux sanguin et par conséquent une augmentation de la quantité de molécules pouvant arriver au site.

De plus, la perméabilité vasculaire augmente au niveau du site. Cette augmentation couplée à une augmentation de la pression hydrostatique dans les vaisseaux (à cause du flux sanguin) et à une augmentation de la pression osmotique du fluide extravasculaire, va entraîner la fuite de fluide des vaisseaux sanguins vers le milieu extravasculaire. À cause de cette fuite, le sang devient plus visqueux, permettant ainsi un ralentissement du flux sanguin dans la région endommagée et donc une meilleure diffusion des composantes nécessaires à la défense de l'organisme à travers les vaisseaux sanguins jusqu'au site. La fuite du fluide est à l'origine de l'œdème inflammatoire. La douleur, elle, est due à l'œdème et à la relâche de facteurs inflammatoires et de médiateurs de la douleur. Quant à la perte de fonction il s'agit d'une conséquence de l'œdème et de la douleur.

Le fluide s'échappant contient des protéines plasmatiques à haut poids moléculaire telles que l'albumine, l'immunoglobuline et la fibrine, mais aussi des anticorps, des facteurs du complément, des enzymes protéolytiques et des nutriments pour les cellules inflammatoires. Le fibrinogène entraîne la coagulation du liquide qui

peut constituer un obstacle physique à la propagation de l'agent infectieux. De plus, le fluide permet de diluer les toxines souvent sécrétées par les bactéries lors de l'infection et de diminuer leur impact (Rankin, 2004).

Enfin, le fluide extra-vasculaire est retiré par le système lymphatique. Ainsi les antigènes sont transportés jusqu'aux ganglions lymphatiques où la réponse immunitaire peut être initiée.

Les différentes étapes décrites ci-dessus ne sont pas successives, elles peuvent être simultanées et même se chevaucher.

En général, une réaction inflammatoire durant moins de trois semaines est considérée comme aiguë tandis qu'une réaction se prolongeant sur plus de trois semaines est considérée comme chronique. Cependant, les médiateurs impliqués dans les deux types de réaction peuvent différer.

## **2- Les médiateurs de la réponse inflammatoire aiguë**

La réaction inflammatoire implique une multitude de médiateurs interagissant de manière complexe. Certains sont endogènes, d'autres sont exogènes; certains sont déjà présents à l'état normal et sont responsables de la réponse immédiate, d'autres sont produits suite au dommage.

### **2.1 Histamine et sérotonine**

L'histamine et l'hydroxytryptamine (sérotonine) sont des médiateurs responsables de la réponse immédiate au dommage. L'histamine est sécrétée par les mastocytes, cellules localisées près des veinules et des surfaces sous-cutanées et muco-sales. Ces

cellules relâchent l'histamine contenue dans des granules. L'histamine augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins ainsi que la contraction du muscle lisse des voies respiratoires et est responsable de la production nasale de mucus. La sérotonine qui joue le même rôle que l'histamine est relâchée par les plaquettes sous l'effet d'une protéine, le PAF (*platelet activating factor*).

## 2.2 Les protéases plasmatiques

Trois systèmes de cascades de protéases plasmatiques sont impliqués dans la formation de peptides qui jouent un rôle dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Le système de la kinine est impliqué dans la production de bradykinine à partir de précurseurs. La bradykinine est responsable de la dilatation des artérioles, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la douleur.

Le système fibrinolytique est responsable de la formation de plasmine à partir d'un précurseur, le plasminogène. La plasmine digère la fibrine qui est responsable de la formation de caillots dans le sang, produit de la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire et active un précurseur de la bradykinine, le facteur de Hageman, activant ainsi tout le système kinine. La fibrine peut également activer le système du complément.

Ce dernier système est composé de protéines plasmatiques et membranaires qui interagissent via des cascades de signalisations afin d'organiser la réponse vasculaire. Les protéines du complément sont responsables entre autres du recrutement des leucocytes phagocytaires, de l'opsonisation des antigènes par les cellules phagocytaires et du dommage fait aux cellules cibles.

### 2.3 Les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont des métabolites de l'acide arachidonique. Deux classes d'eicosanoïdes sont impliquées dans l'inflammation : les prostaglandines et les leucotriènes. Les prostaglandines et les leucotriènes sont synthétisées lors du métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase et la lipoxycgénase respectivement. Ces acides gras sont synthétisés en réponse à plusieurs stimuli et sont impliqués dans une variété de réponses physiologiques. Les prostaglandines  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGF}_{2A}$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$  et thromboxane  $\text{A}_2$  sont impliquées dans l'inflammation. La  $\text{PGI}_2$  et la  $\text{PGE}_2$  sont impliquées dans la vasodilatation et la perméabilité vasculaire, la  $\text{PGE}_2$  induit la fièvre, la  $\text{PGE}_{2A}$  induit la contraction du muscle lisse ainsi que la bronchoconstriction tandis que la thromboxane  $\text{A}_2$  induit la vasoconstriction et l'agrégation des plaquettes. Quant aux leucotriènes ils sont produits par les neutrophiles et les mastocytes. La  $\text{LTB}_4$  est un agent chimiotactique qui augmente aussi l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium pendant la réponse cellulaire. Les leucotriènes  $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$  et  $\text{LTE}_4$  stimulent entre autres la sécrétion de mucus et augmentent la perméabilité vasculaire

### 2.4 Le PAF (Platelet Activating Factor)

Le PAF est un acide gras sécrété par certaines cellules inflammatoire, les cellules endothéliales et les cellules des tissus endommagés, et dont le rôle est d'induire l'agrégation des plaquettes, de produire la vasodilatation et de stimuler le métabolisme de l'acide arachidonique et la relâche de sérotonine.

## 2.5 Les neuropeptides

A la suite du dommage au tissu les nerfs sensoriels sont activés ce qui conduit à la relâche de neuropeptides dont le rôle est de stimuler la relâche d'histamine et la production d'eicosanoïdes et d'augmenter l'adhérence des cellules inflammatoire. Ils peuvent aussi agir en tant que facteurs chimiotactiques.

## 2.6 Les radicaux libres

La plupart des radicaux libres sont relâchés par les cellules phagocytaires lors de la réaction inflammatoire. Les deux voies de production des radicaux libres lors de l'inflammation sont les enzymes NADPH oxydase (source de dérivés radicalaires de l'oxygène) et NOS (source de monoxyde d'azote). Les oxydants produits par ces deux voies sont responsables de dommages causés à l'organisme envahisseur. Dans le foie, les cellules macrophages appelées cellules de Kupffer sont responsables des mécanismes de défense contre les microorganismes et leurs toxines. En présence de stimuli, elles vont relâcher de l'ion superoxide ainsi que d'autres produits aux effets cytotoxiques et pro-inflammatoires et promouvoir la migration de cellules immunitaires vers le foie (Teutelhofer et coll., 2005).

Les radicaux libres peuvent également intervenir dans les processus physiologiques de l'inflammation (voir partie 3) en tant que médiateurs dans les voies de signalisation.

## 2.7 Les cytokines

Afin d'interagir entre elles les différentes cellules inflammatoires peuvent communiquer grâce à des médiateurs appelés cytokines ou interleukines, qui ont un rôle important dans l'inflammation. Les cytokines sont des glycoprotéines produites par une grande variété de cellules aux actions pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. Les cytokines ont généralement une action autocrine ou paracrine c'est à dire qu'elles peuvent agir sur la cellule qui les a secrétées ou agir sur une cellule voisine.

Leur action consiste à se fixer sur les récepteurs des cellules cibles ce qui provoque le déclenchement de voies de signalisation qui conduisent à l'augmentation, à l'induction ou à l'inhibition de certains gènes. Les facteurs de transcription impliqués dans la voie de signalisation vont agir sur les gènes. Les gènes activés vont produire des substances nécessaires à la réponse inflammatoire. Différentes cytokines peuvent avoir la même cible et agir en synergie. De plus, il n'est pas rare, que des cellules différentes produisent la même cytokine (Rankin, 2004). Les facteurs chimiotactiques dont le rôle est d'attirer les cellules en les faisant migrer selon leur gradient de concentration sont aussi des cytokines.

Les médiateurs mentionnés ci-dessus sont secrétés par des cellules inflammatoires activées lors du dommage. Leur action est souvent autocrine c'est-à-dire que les médiateurs agissent sur les cellules qui les ont secrétés.



## **II- Régulation du cytochrome P450 par l'inflammation**

La première observation de régulation des CYP lors d'une réponse de défense de l'organisme se fit lorsque des chercheurs remarquèrent que les effets du pentobarbital étaient très augmentés lorsque le réticulum était exposé à des particules de bleu de trypan, un irritant (Samaras et Dietz, 1953). Il a été ensuite démontré que le cytochrome P450 pouvait être modulé par des pathologies ou par l'activation de mécanismes de défense.

### **1- Régulation du cytochrome P450 par l'infection**

A ce jour, plusieurs exemples de régulation du cytochrome P450 par la pathologie et l'infection ont été démontrés. Ainsi, il a été montré que chez des hamsters cardiomyopathiques, la maladie avait pour conséquence une réduction des niveaux du cytochrome P450 (Renton et coll, 1979). Une autre étude montra que l'administration de vaccin à des rats pouvait diminuer le métabolisme de la phénytoïne à cause d'une diminution de la quantité de cytochrome P450 (Renton, 1979).

Il existe également chez les humains plusieurs observations indiquant que l'infection conduit à un changement de la quantité le cytochrome P450 et par conséquent du métabolisme. En 1978, Chang et coll. observèrent que chez des patients infectés par le virus de l'*influenza A*, la clairance de la théophylline était diminuée (Chang et coll., 1978). Il fut ensuite découvert que cette diminution était liée à une réduction de la quantité de cytochrome P450 lors de l'infection (Renton, 1978). A Toronto, des chercheurs de l'Hôpital pour enfants malades ont d'ailleurs noté que lors d'épidémies d'influenza, le nombre de patients présentant des niveaux toxiques de théophylline était

significativement augmenté par rapport à la normale c'est-à-dire en absence d'épidémie (Koren et Greenwald, 1985).

D'autres infections non virales ont également été identifiées chez les humains comme étant responsables de changements au niveau du métabolisme des médicaments. Ainsi, la clairance de la quinine est altérée durant la malaria (Akinyinka et coll., 2000) et la clairance de l'antipyrine est également diminuée chez des patients atteints de pneumonie et d'autres infections bactériennes (Sonne et coll., 1985).

## **2- Régulation du cytochrome P450 par l'inflammation**

En ce qui concerne l'inflammation, il a été observé chez plusieurs modèles animaux que l'inflammation affectait les niveaux de cytochrome P450.

L'administration d'agents comme le sulfate de dextran, génère une réaction inflammatoire et conduit à l'inactivation de plusieurs isoformes du cytochrome P450 hépatique chez la souris. Il a été démontré que le sulfate de dextran inhibait la biotransformation dans le foie, via un facteur relâché par les cellules de Kupffer (Peterson and Renton, 1984). A ce jour, il a été démontré qu'il existe une foule d'agents pouvant causer une réaction inflammatoire chez des animaux et qui induisent une modification du cytochrome P450. Des agents comme le zymosan ou le bleu de trypan ont le même effet que le sulfate de dextran. L'administration d'adjuvants, d'irritants ou de vaccins peut aussi conduire à une réaction inflammatoire qui modifie le P450. Ainsi, l'inflammation induite par l'administration de térébenthine, de carragénine ou de LPS (lipopolysaccharide d'origine bactérienne) provoque des changements de CYP chez les animaux. Chez les rats, l'administration de LPS diminue le P450 via les effets du

monoxyde d'azote (Oyekan, 1995); lorsque la carragénine est administrée à des rats, le métabolisme de l'hexobarbital et de la zoxazolamine est diminué chez ces animaux (Ishikawa et coll., 1990); enfin, lorsque la térébenthine est administrée de manière sous-cutanée à des lapins, la réaction inflammatoire diminue plusieurs isoformes du cytochrome P450 via plusieurs voies de signalisation (Barakat et du Souich, 1996).

Chez les humains, l'administration de LPS induit aussi une réaction inflammatoire associée à une diminution de la clairance de l'antipyrine, de la théophylline et de l'hexobarbital, médicaments métabolisés par le cytochrome P450 (Shedlofsky, 1994 et 1997).

Chez certains humains atteints de maladies inflammatoires telles que le lupus, la proportion de personnes ayant une activité réduite du CYP2D6 est plus que doublée par rapport à une population saine, ce qui pourrait s'expliquer par une régulation négative de cette enzyme chez ces patients (Baer et coll., 1986). De plus, chez certaines personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde, il a été observé que les niveaux sanguins de vérapamil étaient augmentés tandis que la clairance de ce médicament était, elle, diminuée (Mayo et coll., 2000). Ce changement pourrait être dû à un changement dans les niveaux de cytochrome P450.

### III- Mécanismes de régulation du cytochrome P450 lors de l'inflammation

Étant donné la diversité d'agents et de substances qui modifient la régulation de différentes enzymes de la famille du cytochrome P450, il semble qu'il existe plusieurs processus et voies modulant l'activité et/ou l'expression du cytochrome P450. Dans la plupart des cas, la réaction inflammatoire régule le cytochrome P450 en diminuant l'expression. Néanmoins, certains cas d'induction existent : par exemple, certaines particules irritantes induisent le CYP4A, tandis que l'hépatite B et C induisent le CYP 2A6 (Renton, 2001).

Les interférons et les interleukines relâchés pendant la réaction inflammatoire sont impliqués dans la modulation du cytochrome P450 lors de la réaction de défense de l'organisme. En effet il été montré que des préparations d'IFN- $\alpha$ , d'IFN- $\beta$  et d'IFN- $\gamma$  recombinants humains pouvaient diminuer les niveaux de cytochrome P450 hépatique chez la souris (Parkinson et coll., 1982; Carelli et coll., 1996; Calleja et coll., 1998). De plus, l'administration d'IFN- $\alpha$  recombinant à des humains affecte la biotransformation de plusieurs substances métabolisées par les isoformes du cytochrome P450 comme l'antipyrine (Williams et Farrell, 1986), la théophylline (Williams et coll., 1987) et l'érythromycine (Craig et coll., 1993).

*In vitro*, l'IL-6 diminue l'expression du CYP1A1, du CYP1A2 et du CYP3A3 dans des cellules d'hépatomes humains (Fukuda et coll., 1992, Fukuda et Sassa 1994). Dans des hépatocytes de rongeurs, l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , et l'IL-6 diminuent l'activité des isoformes CYP1A1/2 et CYP1B1/2 (Barker et coll., 1992;; Clark et coll., 1995).

Chez le lapin ayant une réaction inflammatoire suite à une injection de térébenthine, des médiateurs sont relâchés dans le sérum *in vivo* et conduisent à une inactivation et à une diminution de la quantité de cytochrome P450 (El-Kadi et coll., 1997). En effet, lorsqu'on incube des hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire avec du sérum de lapin ayant une réaction inflammatoire on observe une diminution de l'activité (après 4h) des isoformes CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 du cytochrome P450. Des analyses chromatographiques ont permis d'identifier les médiateurs sériques responsables de cette modulation : l'IL-6 et l'INF- $\gamma$  (Bleau et coll., 2000). Par contre, lorsqu'on incube des hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire avec du sérum provenant d'humains ayant une infection virale, ce sont l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  présents dans le sérum qui sont responsables de la diminution d'activité des isoformes du cytochrome P450 dans les hépatocytes (Bleau et coll., 2000).

A plus long terme, après 24h d'incubation, des études similaires ont démontré que le sérum provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire ou d'humains ayant une infection virale était capable de diminuer l'expression des isoformes du cytochrome P450 (Bleau et coll., 2001). Les médiateurs sériques responsables de cette diminution de l'expression sont l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  dans le sérum de lapin et l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'INF- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  dans le sérum humain (Bleau et coll., 2003)

Il semble que les différentes cytokines montrent une certaine sélectivité envers les isoformes modulés même s'il est difficile d'établir des associations claires du fait d'interactions complexes existant entre les cytokines (Renton, 2001).

## **1- Mécanismes pré-transcriptionnels de modulation par les cytokines**

Pour la plupart des isoformes du cytochrome P450, la diminution de l'activité et de la synthèse est précédée par une diminution de la quantité d'ARN messager (Renton, 2001). L'inflammation induite par la térébenthine diminue la transcription du CYP2C11 chez les rats mâles (Wright et Morgan, 1990), tandis que l'IL-1 diminue la vitesse de transcription du CYP1A1 et du CYP1A2 dans des hépatocytes isolés (Barker et coll., 1992). L'IL-6 peut réguler la transcription du CYP1A1 dans des cellule d'hépatomes humains (Fukuda et Sassa, 1994). De même l'interféron diminue la vitesse de transcription des CYP1A1 et CYP1A2 dans des hépatocytes de rats (Delaporte et Renton, 1997).

Les cytokines régulent généralement la transcription des protéines en agissant sur des facteurs de transcription. Il a été démontré que le NF- $\kappa$ B est impliqué dans la régulation de la transcription du CYP2C11 par l'IL-1 $\beta$  (Iber et coll., 2000) et que le NF-1, un autre facteur de transcription était impliqué dans la modulation du CYP1A1 par le TNF- $\alpha$ . (Morel et Barouki 1998).

Les récepteurs nucléaires CAR et PXR pourraient également moduler le cytochrome P450. En effet, chez les souris la diminution de l'ARN messager du CYP2B et du CYP3A suite à un traitement au LPS est associée à une répression du CAR et du PXR (Beigneux et coll., 2002)

## **2- Mécanismes post-transcriptionnels de modulation par les cytokines**

Les changements au niveau post-transcriptionnel représentent une petite partie des cas de régulation du cytochrome P450. Néanmoins, des études ont démontré qu'en plus

des mécanismes pré-transcriptionnels impliqués dans la modulation du CYP1A1 par l'interféron chez la souris, on observe une augmentation de la dégradation de l'ARN messager (Delaporte et Renton, 1997). De plus, la modulation du CYP2E1 par des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ) pourrait impliquer des changements dans la stabilité de l'ARN messager (Hakkola et coll., 2003).

### **3- Monoxyde d'azote et dérivés radicalaires de l'oxygène**

Nombre de cellules inflammatoires sécrètent des dérivés radicalaires de l'oxygène (DRO). Ces radicaux libres semblent eux aussi moduler le cytochrome P450. *In vitro*, le stress oxydatif inhibe la transcription du CYP1A1 via le facteur de transcription NF-1 (Morel et Barouki, 1998). Chez le lapin, lors d'une réaction inflammatoire provoquée par l'injection de térébenthine, laquelle est associée à une diminution du cytochrome P450, on observe une augmentation de la peroxydation des lipides ainsi qu'une diminution de l'activité des systèmes antioxydants indiquant une augmentation des DRO (Proulx et du Souich, 1995). De plus, le sérum de lapin ayant une réaction inflammatoire suite à l'injection de térébenthine incubé avec des hépatocytes provenant de lapin ayant une réaction inflammatoire cause une diminution de la quantité et de l'activité du cytochrome P450 dans les hépatocytes, diminution associée à une augmentation de la peroxydation des lipides. L'incubation d'hépatocytes avec du sérum d'humains ayant une infection virale produit le même effet (El-Kadi et coll., 1997). La diminution de la quantité et de l'activité du P450 observées peut être prévenue de manière dose-dépendante par des antioxydants et par le L-NAME, un inhibiteur du NO $\cdot$  (El-Kadi et coll., 2000). Par contre, la présence de H $_2$ O $_2$ , de sodium nitroprussiate (une source de NO $\cdot$ ) et d'inhibiteurs

d'antioxydants augmente la diminution d'activité et de quantité du CYP P450 (El-Kadi et coll., 2000). Ceci indique un rôle des radicaux libres dans la régulation du cytochrome P450 lors d'une réaction inflammatoire.



## **PARTIE III : LES RADICAUX LIBRES**

Les radicaux libres générés pendant la réaction inflammatoire ont été associés à une modulation du cytochrome P450. Dans cette partie, nous examinerons, la source et les conditions de production des radicaux libres, en particuliers les dérivés radicalaires de l'oxygène. Nous étudierons leur rôle dans la signalisation cellulaire afin de mieux comprendre comment ils pourraient réguler le cytochrome P450.

### **I- Définition**

Le terme radical libre définit des espèces chimiques ayant un nombre impair d'électrons dans leurs orbitales. Les atomes sont stables lorsque que leur nuage atomique est rempli d'électrons. Le nuage est constitué d'orbitales, chaque orbitale pouvant contenir au maximum deux électrons. Les atomes ou les molécules avec un seul électron dans leur orbitale ont tendance à être très instables.

Les radicaux libres sont formés lorsqu'un lien covalent est brisé ce qui laisse chaque molécule avec un des électrons impliqués dans le lien. Ils peuvent aussi être formés lorsqu'un atome ou une molécule accepte un électron lors d'une réaction d'oxydoréduction.

#### **1- Les dérivés radicalaires de l'oxygène**

Une molécule d'oxygène contient deux électrons «célibataires» dans deux orbitales différentes mais situées sur le même nuage. A cause de leur localisation sur le même nuage, les deux électrons peuvent former un lien relativement stable et ainsi stabiliser la molécule entière. Si l'un des deux électrons est excité et change de nuage, la molécule

devient un oxydant car les deux électrons peuvent alors accepter d'autres électrons provenant d'autres molécules afin de former une nouvelle paire d'électrons.

Un gain d'électron transforme la molécule d' $O_2$  en ion superoxide  $O_2^-$ , un radical libre qui est non seulement réactif, mais qui peut à son tour donner naissance à d'autres espèces radicalaires extrêmement réactives.

L'enzyme superoxyde dismutase va catalyser la formation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à partir du  $O_2^-$ . Cette molécule n'étant pas un radical est plus stable que l'ion superoxide, mais peut en présence de certains métaux, en général le fer ( $Fe^{2+}$ ), donner naissance à d'autres radicaux libres dont certains extrêmement réactifs et toxiques comme l'ion hydroxyle ( $OH\cdot$ ). L'ion superoxyde peut également réagir avec d'autres radicaux comme le monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ ) pour former, entre autres, la peroxy-nitrite ( $ONOO\cdot$ ), un puissant oxydant. Le terme espèces oxygénées réactives définit toutes les molécules et radicaux libres qui sont dérivés de l'oxygène moléculaire (Fig. 5).

## **2- Les dérivés radicalaires de l'azote**

La molécule d'azote peut elle aussi donner naissance à des radicaux libres dont le plus connu est sans doute le monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ ), un radical libre gazeux qui exerce de multiples fonctions dans l'organisme entre autres la vasodilatation. D'autres dérivés radicalaires de l'azote existent également entre autres le  $N_2O_3$ , le  $NO_2^-$ , le  $ONOO\cdot$ , tous de puissants oxydants (Zorov et coll., 2005).

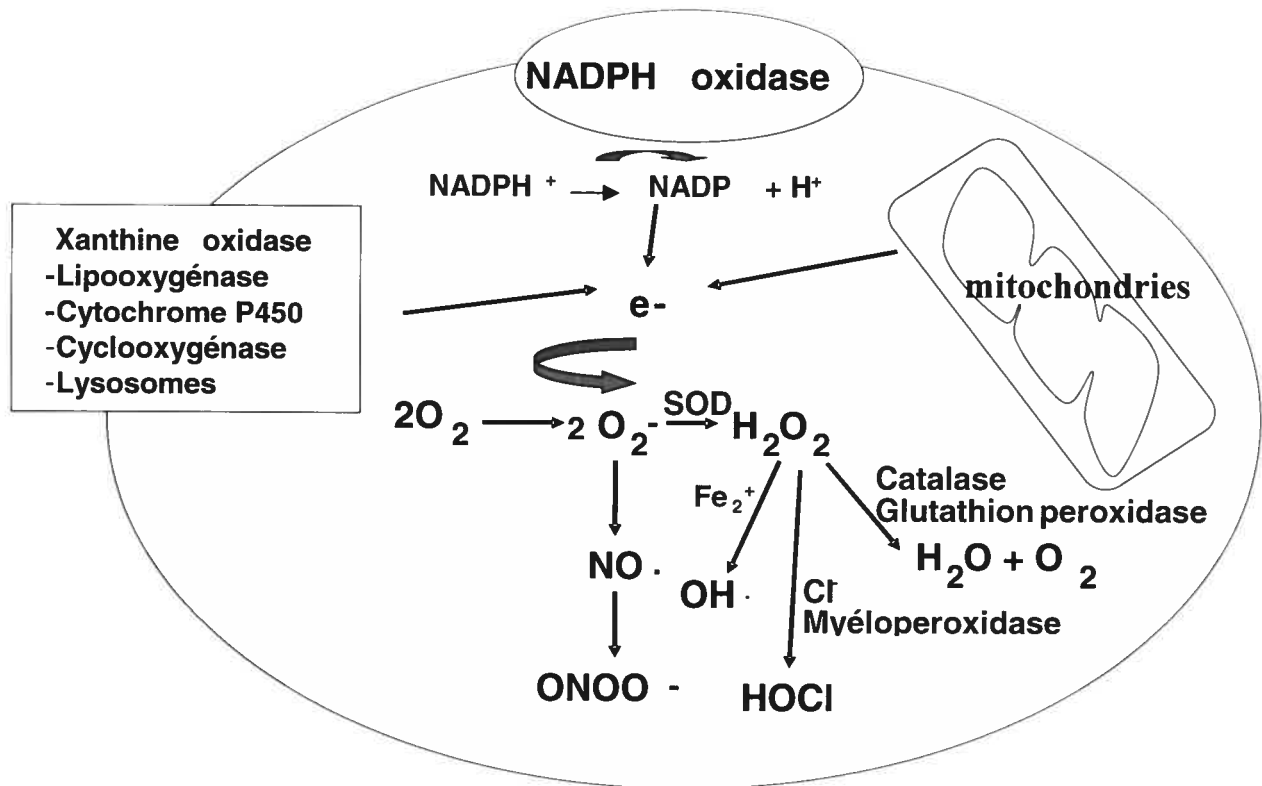


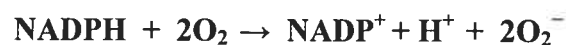
Figure 5. Les principaux dérivés radicalaires de l'oxygène et leur source

## II- Les sources des dérivés radicalaires de l'oxygène

*In vivo*, l'ion superoxide, précurseur de la plupart des espèces oxygénées réactives, peut provenir de sources enzymatiques ou non enzymatiques.

### 1- La NADPH oxydase

La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase ou NADPH oxydase, est une enzyme qui catalyse la formation d'ion superoxide selon la réaction suivante (Ago et coll., 1999) :



Cette enzyme se retrouve dans les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes et les macrophages à certaines phases de leur développement. Sa fonction dans ces cellules est de synthétiser des agents qui vont tuer les organismes entrant en contact avec les phagocytes lors de la réaction inflammatoire (Babior, 2004).

La NADPH oxydase se retrouve aussi dans les reins, l'endothélium et la rate où elle produit de l'ion superoxide en plus petite quantité que dans les phagocytes. Dans ces cellules, l'ion superoxide sert principalement à la signalisation (Babior, 2004).

## **2- La cyclooxygénase et la lipoxygénase**

La cyclooxygénase est l'enzyme responsable de la formation de plusieurs eicosanoïdes dont les prostaglandines, la thromboxane et la prostacycline. En effet, elle catalyse la transformation d'acide arachidonique en prostaglandine  $H_2$ , la première étape de la série de réactions qui va donner naissance aux autres métabolites de l'acide arachidonique. La lipoxygénase est une autre enzyme catalysant l'oxydation de l'acide arachidonique pour donner naissance à d'autres eicosanoïdes, les leucotriènes. En présence de NADPH, ces deux enzymes produisent du superoxyde pendant leur activité catalytique (Kukreja et coll., 1986).

## **3- Les lysosomes et les péroxysomes**

Les lysosomes et les péroxysomes sont des organelles dont l'une des fonctions est la dégradation des macromolécules. Elles sont également impliquées dans plusieurs autres processus physiologiques dont le remodelage osseux et la synthèse de composés lipidiques (Moldovan et Moldovan, 2004).

Les membranes lysosomales contiennent une chaîne de transport d'électrons composée de NADH, FAD, de cytochrome b et d'ubiquinone. Cette chaîne permet au lysosome d'accumuler assez de protons pour maintenir son pH (Gille et Nohl, 2000). Durant ce transport d'électrons, l'ion hydroxyle  $\text{OH}^-$  est formé. L'importance physiologique de cette réaction n'est pas encore connue (Nohl et Gille, 2002).

Dans le peroxysoxe, se trouvent plusieurs enzymes qui produisent des radicaux libres pendant leur activité, entre autres, le cytochrome b5, le cytochrome P450 et la xanthine oxydase. Il en résulte la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et de  $\text{OH}^-$  (Moldovan et Moldovan, 2004)

#### **4- Le cytochrome P450**

L'activité catalytique du cytochrome P450 produit l'ion superoxyde et par conséquent du  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En effet, l'ion superoxyde peut être formé lors de la troisième étape du cycle catalytique où la molécule d'oxygène peut être réduite au lieu d'être liée au substrat. De plus, des électrons provenant des groupements flavine de la NADPH réductase peuvent aller se lier à l'oxygène (Jezek et Hlavata, 2005). La quantité de radicaux libres produits varie selon les isoformes, le CYP2E1 étant l'isoforme produisant le plus de superoxyde (Dai et coll, 1993). Enfin, les enzymes de la famille du cytochrome P450 sont impliquées dans la synthèse et le métabolisme des eicosanoïdes contribuant donc indirectement à la génération de radicaux libres lors de ces réactions.

### 5- La xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase est une enzyme essentielle au catabolisme des purines chez les mammifères. Elle catalyse la transformation de l'hypoxanthine en xanthine puis celle de la xanthine en acide urique. Cette enzyme se retrouve sous deux formes interconvertibles : la xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase (Stirpe et Della Corte, 1969).

La xanthine oxydoréductase génère de l'ion superoxyde puis du peroxyde d'hydrogène lors de la synthèse de xanthine et d'acide urique :



### 6- Les mitochondries

Les mitochondries font partie des sources non-enzymatiques d'ion superoxyde et en sont l'une des sources les plus importantes dans la cellule (Turrens, 2003). Ce sont des organelles dont la fonction principale est de convertir du matériel organique en source d'énergie pour la cellule, énergie accumulée sous forme d'ATP (Figure 6). L'énergie provient des électrons retirés lors de l'oxydation du substrat organique qui vont passer au travers d'une chaîne de transport d'électrons. Les électrons provenant de la NADH ou de la FADH, produits de la glycolyse et du cycle de Krebs, sont donnés à une série de transporteurs situés sur la membrane intérieure de la mitochondrie. La dernière molécule à accepter l'électron est la molécule d'oxygène qui est par conséquent réduite à l'eau. Pendant que les électrons passent à travers cette chaîne respiratoire, des changements de conformation au niveau des transporteurs, amènent des protons à traverser la membrane

intérieure, conduisant ainsi à l'établissement d'un gradient de protons. Le mouvement des protons à travers la membrane mitochondriale produit l'énergie nécessaire pour transformer l'ADP en ATP (Figure 6).

La chaîne de transport d'électrons située dans les mitochondries contient plusieurs centres d'oxydoréduction où des électrons peuvent être cédés à l'oxygène. Ceci s'explique par le fait que plusieurs des membres de la chaîne respiratoire, les flavoprotéines, les agrégats de fer et de sulfure ainsi que l'ubisemiquinone, sont dans un état réduit dans la mitochondrie ce qui les rend capables de donner un électron. De plus, la plupart des réactions de la chaîne respiratoire impliquent un seul électron favorisant ainsi la réduction monovalente de l'oxygène (Turrens, 2003).

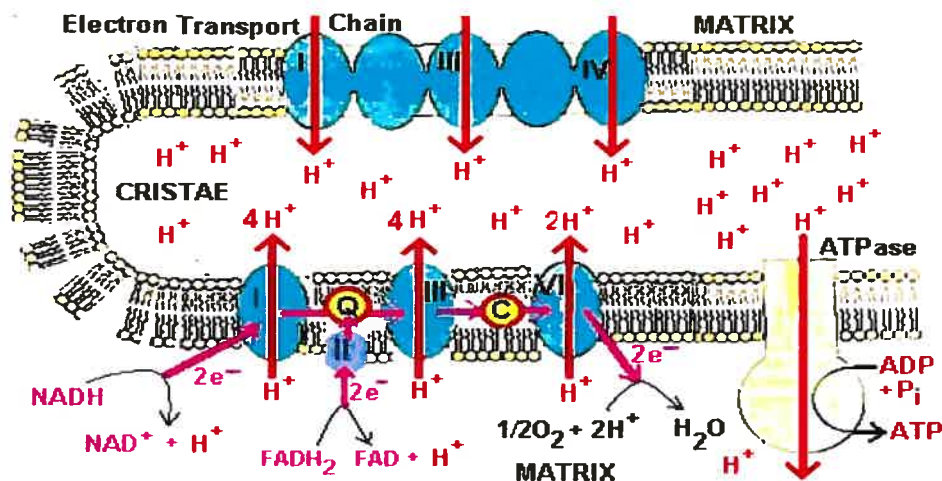


Figure.6 La chaîne de transport des électrons dans les mitochondries, Source : <http://www.prism.gatech.edu/>

Le superoxyde est produit par les complexes I (NADH déshydrogénase) et III (ubiquinol-cytochrome c réductase), ainsi que par la monoamine oxydase lors de

l'activation de la chaîne respiratoire (Figure 7). Certaines sources attribuent également une partie de la production radicalaire au complexe II (succinate déshydrogénase) (Jezek et Hlavata, 2005).

Il en résulte une production de superoxyde des deux cotés de la membrane interne des mitochondries, dans l'espace intermembranaire et dans la matrice mitochondriale, et dans la membrane externe. L'importance relative de chaque complexe à la production globale de radicaux libres dans la cellule varie selon l'organe ou le tissu étudié et l'état d'activité de la mitochondrie (Barja, 1999). La production de radicaux libres par le complexe I a été associée à une variété de pathologies comme la maladie de Parkinson (Barja et Herrero, 1998; Betarbet et coll., 2002; Kushnareva et coll., 2002; Nicholls, 2002; Sherer et coll., 2003*a,b*; Trojanowski, 2003).

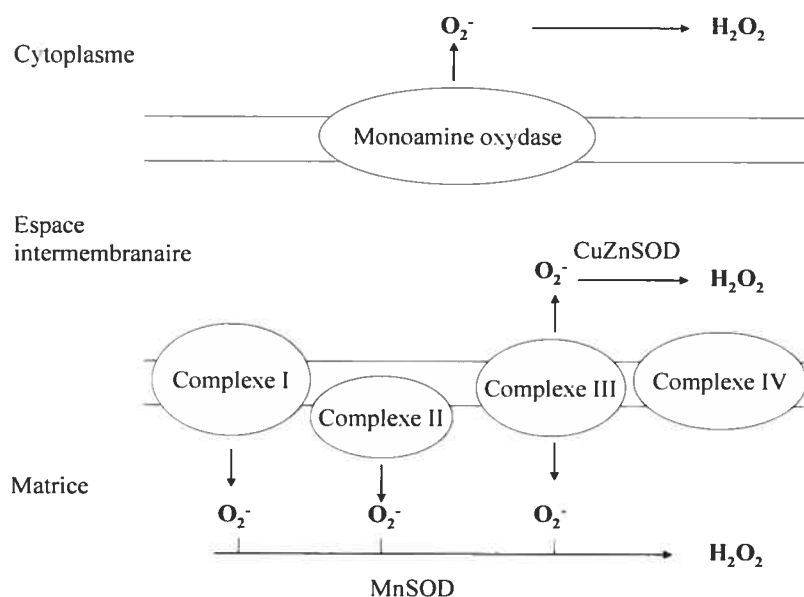


Figure.7 Sites de formation de l'ion superoxyde dans la chaîne respiratoire. Adapté de Turrens, 2003



Le superoxyde généré dans la matrice mitochondriale est en général dégradé par des enzymes antioxydantes (Fig.7). Celui généré dans l'espace intermembranaire peut se retrouver dans le cytoplasme via certains canaux ioniques (Hans et coll., 2003).

#### **7- Autres sources non enzymatiques**

L'ion superoxyde peut provenir de sources non-enzymatiques lorsqu'un électron est cédé à l'oxygène par des coenzymes réduites, par les groupes prosthétiques de certaines protéines comme ceux des flavoprotéines ou ceux des 'groupes de fer sulfurés' ou même par certains xénobiotiques qui ont auparavant été réduits comme l'adriamycine, un agent anticancéreux ou le paraquat, un herbicide (Turrens, 2003).

### **III- Rôle physiologique des dérivés radicalaires de l'oxygène**

Du fait de leur haute réactivité et de leur instabilité, les radicaux libres ont longtemps été perçus comme des molécules néfastes pour l'organisme. Néanmoins, ces dernières années, de nombreuses observations ont mis en lumière leur rôle physiologique lors de la signalisation cellulaire.

#### **1- Les radicaux libres et la signalisation cellulaire**

Les dérivés radicalaires de l'oxygène sont des molécules de petite taille pouvant facilement diffuser à travers les membranes cellulaires ce qui facilite leur implication dans la signalisation cellulaire (Hancock et coll., 2001). Leur rôle a été mis en évidence

dans des processus physiologiques comme l'apoptose, la nécrose, la différenciation et la prolifération cellulaire. La modulation de ces processus se fait par plusieurs mécanismes.

### 1.1 Modulation de l'expression génique

Plusieurs études ont démontré que le peroxyde d'hydrogène module l'expression de plusieurs gènes dont le *c-fos*, le *c-myc* (Crawford et coll., 1988) et le *c-jun* dont l'expression augmente de manière dose dépendante dans des cellules HeLa (lignée cellulaire cancéreuse du col de l'utérus) suite à une exposition au peroxyde d'hydrogène (Devary et coll., 1991). Ces gènes sont impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire.

Des études avec les puces à ADN ont également démontré que le peroxyde d'hydrogène double l'expression de plus d'une centaine de gènes tandis qu'il réduit de moitié l'expression d'une centaine d'autres (Hancock et coll., résultats non publiés, Hancock et coll., 2001). Ces gènes n'ont pas encore été caractérisés.

Enfin, il a été démontré que le  $H_2O_2$  active des facteurs de transcription comme le NF- $\kappa$ B et l'AP-1. En effet, le  $H_2O_2$  induit la translocation du NF- $\kappa$ B vers le noyau dans des cellules T humaines (Schreck et coll., 1991), tandis qu'il induit l'activité de l'AP-1 dans des cellules du muscle vasculaire lisse (Rao et coll., 1996).

### 1.2 Modulation de l'activité des kinases et des phosphatases

Il a été démontré *in vitro* que le  $H_2O_2$  pouvait activer certaines MAP kinases telles que la protéine ERK2 (*extra cellular signal related protein kinase*) (Guyton, 1996) induisant ainsi la phosphorylation de protéines. Le  $H_2O_2$  peut également induire d'autres

kinases comme le *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et le p38 MAP kinase (Guyton, 1996). La phosphorylation des protéines peut constituer une étape dans la transduction du signal dans beaucoup de cellules.

Les récepteurs associés à la tyrosine kinase comme le récepteur de l'insuline ainsi que certaines protéines à activité tyrosine kinase peuvent être activés par des oxydants tels que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou le pervanadate (Kadota et coll., 1987; Schieven et coll., 1993).

Parallèlement, dans d'autres études *in vitro*, on observe que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut inhiber des protéines tyrosine phosphatases par l'oxydation de résidus de cystéine sur le site actif de ces enzymes (Wu et coll., 1998). Ainsi, l'augmentation apparente de la phosphorylation des tyrosines par le stress oxydatif pourrait donc être due à une inhibition des phosphatases. D'autres kinases comme celles de la famille des JAK (*Janus Activated Kinases*) et des src peuvent également être activées par les dérivés radicalaires de l'oxygène (Aikawa et coll., 1997; Abe et Berk, 1999).

### 1.3 Régulation du calcium intracellulaire

On sait que les dérivés radicalaires de l'oxygène peuvent induire des changements dans la concentration de calcium intracellulaire. Le calcium provient des réserves intracellulaires situées dans le réticulum endoplasmique et sarcoplasmique et de l'extérieur de la cellule (Roveri et coll., 1992). Les observations effectuées au cours des dernières années, entre autres dans le muscle vasculaire lisse et dans les artères coronaires, ont indiqué que le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène étaient capables d'inhiber l'activité des transporteurs de calcium dans le réticulum sarcoplasmique ce qui

favoriserait la diffusion de calcium du réticulum vers le cytosol (Grover et coll., 1988 et 1992; Suzuki et Ford; 1991 et 1992).

#### 1.4 Autres rôles

D'autres enzymes impliquées dans la transduction du signal cellulaire comme les phospholipases A<sub>2</sub> et C ainsi que la guanylyl cyclase peuvent être modulées par les dérivés radicalaires de l'oxygène (Burke-Wolin et coll., 1991; Goldman et coll., 1994)

## **2- Mécanismes d'action des dérivés radicalaires de l'oxygène**

### 2.1 Altération de l'état redox de la cellule

L'activité des protéines impliquées dans la signalisation dépend de l'état de réduction de la cellule. Comparé au milieu extracellulaire, le cytosol offre en général des conditions plus favorables aux réactions de réduction qu'à celles d'oxydation. Ceci est dû principalement à la présence de molécules telles que le glutathion (GSH) et la thiorédoxine (TRX). En effet ces molécules sont maintenues de manière prédominante à l'état réduit par les enzymes GSH réductase et TRX réductase (Thannickal et Fanburg, 2000). La GSH et la TRX ont normalement une fonction d'antioxydants car ils peuvent réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les lipopéroxydes.

Des changements dans les niveaux de glutathion modulent l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans des cellules L6 dérivées du muscle squelettique (Sen et coll., 1997) ainsi que certains processus comme la différenciation de cellules humaines myéloïdes (Esposito et coll., 1994). Dans les cellules endothéliales de veau, les changements dans les ratios de la forme oxydée à la forme réduite affectent la concentration de calcium intracellulaire (Henschke et Elliott, 1995).

Quant à la TRX, elle a été impliquée dans la régulation de facteurs de transcription, entre autres, l'AP-1 (Hirota et coll., 1997), le NF- $\kappa$ B (Hirota et coll., 1999) et le p53 (Pearson et Merrill, 1998).

## 2.2 Modification directe des protéines

Les dérivés radicalaires de l'oxygène peuvent réguler l'activité des protéines en agissant sur certains acides aminés : si l'acide aminé est situé dans le domaine catalytique d'une enzyme, l'activité de celle-ci peut-être altérée. De même, si l'acide aminé est situé dans le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription l'expression de la protéine peut être modifiée. Les résidus de cystéine sont des cibles communes comme c'est le cas lors de l'inhibition de l'activité de la protéine tyrosine phosphatase 1 mentionnée plus tôt. Les résidus de cystéine peuvent être oxydés par le superoxyde ou le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour former des dérivés (Thannickal et Fanburg, 2000).

L'oxydation de deux molécules de cystéine sur la même protéine peut entraîner la formation de ponts disulfures intramoléculaires ce qui peut changer la conformation de la protéine et son activité. Lorsque les résidus de cystéine sont sur deux protéines distinctes, la formation de ponts disulfures intermoléculaires conduit à des réactions d'homo- ou d'hétérodimérisation qui peuvent conduire à l'activation de la protéine. Des résidus de tyrosine peuvent aussi être oxydés et participer à la dimérisation des protéines (Thannickal et Fanburg, 2000).

Enfin, les agrégats d'ions métalliques que l'on retrouve dans les enzymes pourraient également constituer des cibles pour les dérivés radicalaires de l'oxygène (Thannickal et Fanburg, 2000).

### 3- Les dérivés radicalaires de l'oxygène et la pathologie

Lorsque l'équilibre entre oxydants et antioxydants se perd en faveur des oxydants, on parle de stress oxydatif ou excès de radicaux libres. Le danger des radicaux libres réside dans le fait qu'ils peuvent réagir avec des composants moléculaires de la cellule formant d'autres radicaux libres. Ces réactions peuvent conduire à des modifications ou à la perte de fonction de protéines, à la réticulation de l'ADN et à la peroxydation des lipides. Le stress oxydatif a été impliqué dans l'étiologie d'une multitude de pathologies, les plus connues étant sans doute les maladies neurodégénératives, en particulier la sclérose amyotrophique latérale (Tableau 2). Dans 10% des cas, cette pathologie est d'origine familiale et est associée à une mutation du gène encodant la Cu-Zn superoxyde dismutase (SOD) et conduisant à des réductions de jusqu'à 50% de l'activité de l'enzyme (Valentine, 2002; Andersen, 1995)

Les dérivés radicalaires de l'oxygène jouent également un rôle significatif dans la médiation de la réaction inflammatoire. Ils sont notamment impliqués dans la formation des cytokines. L'un des inducteurs principaux de la transcription des gènes codant pour les cytokines est le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Le NF- $\kappa$ B est présent dans le cytoplasme associé à une protéine inhibitrice le I- $\kappa$ B qui empêche sa translocation dans le noyau. En présence de stimuli comme les dérivés radicalaires de l'oxygène, les cytokines et les mitogènes, le I- $\kappa$ B est dégradé (Adcock et coll., 1994). Ceci permet la translocation du NF- $\kappa$ B vers le noyau où il peut activer la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Li et coll., 2002). Plusieurs antioxydants sont des inhibiteurs du NF- $\kappa$ B (Closa et coll., 2004).

Pathologie	Oxydant impliqués	Mécanismes d'action	Références
Stéatose hépatique non alcoolique	Dérivés radicalaires de l'oxygène	Stress oxydatif dû au dysfonctionnement des mitochondries et à une induction du CYP P450	Sanyal, 2005
Maladies cardiovasculaires (hypertension, diabète, athérosclérose)	Monoxyde d'azote et dérivés radicalaires de l'oxygène	Le stress oxydatif entraîne la destruction du monoxyde d'azote ce qui induit la dysfonction endothéliale	Rush et coll., 2005
Maladie de Parkinson	Dérivés radicalaires de l'oxygène	Génération de dérivés radicalaires de l'oxygène lors du catabolisme de la dopamine, dysfonction mitochondriale	Drukarck et coll., 2001
Maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et de Parkinson)	Superoxyde, hydroxyle, lipoperoxyde, peroxydite	Diminution de la mélatonine, hormone qui désactive certains radicaux libres et stimule la synthèse d'enzymes antioxydantes comme la SOD	Srinivasan, 2002
<b>MALADIES INFLAMMATOIRES</b>			
Maladies allergiques et inflammatoires de la peau (urticaire, psoriasis)	Dérivés radicalaires de l'oxygène	Génération de radicaux libres par les mastocytes et les monocytes en réponse à certains stimuli	Okayama, 2005
Maladies inflammatoires du poumon (asthme, maladie chronique obstructive du poumon)	Dérivés radicalaires de l'oxygène	Déséquilibre entre les systèmes oxydants et antioxydants à l'origine de dommage aux cellules pulmonaires	Kinnula, 2005

Tableau 2. Pathologies associées au stress oxydatif

Les facteurs de transcription activant la transcription de molécules pro-inflammatoires semblent aussi être modulés par le stress oxydatif. Comme mentionné précédemment, des kinases telles que ERK, JNK et p38 peuvent être activées par des radicaux libres et activer ainsi des facteurs de transcription qui régulent la synthèse de molécule pro-inflammatoires (Griendling et coll., 2000).

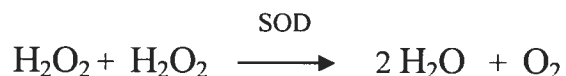
Les dérivés radicalaires de l'oxygène peuvent également activer des cellules endothéliales lors de la réaction inflammatoire qui sont à la fois des sources et des cibles des médiateurs inflammatoires (Closa et coll., 2004).

#### 4- Systèmes antioxydants

Afin de se protéger des effets néfastes des radicaux libres, l'organisme possède plusieurs systèmes antioxydants dont le rôle est d'éliminer ces molécules (Tableau 3). L'ion superoxyde peut spontanément se dismuter formant ainsi le peroxyde d'hydrogène, molécule moins réactive, et l'eau. Cette réaction peut également être catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) selon la réaction suivante :



La molécule de peroxyde d'hydrogène peut à son tour être dégradée pour donner de l'eau et de l'oxygène selon cette réaction :



Une autre enzyme, la glutathione-peroxidase sert également à se débarrasser du peroxyde d'hydrogène.



De plus, il existe des systèmes non enzymatiques capables de désactiver les radicaux libres comme l'  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), l'ascorbate (vitamine C) et l'urée. Ces molécules réagissent directement avec l'oxydant pour le désactiver (Hanukoglu, 2006) :



Radical libre	Nom commun	Système antioxydant
$\text{O}_2\cdot^-$	Ion superoxyde	Superoxyde dismutase
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peroxyde d'hydrogène	Catalase/glutathione peroxydase
$\text{OH}\cdot$	Ion hydroxyle	
$\text{ONOO}\cdot$	Peroxynitrite	
	Espèces oxygénées réactives	Béta-carotène, $\alpha$ -tocophérol, ascorbate

Tableau 3. Résumé des principaux dérivés radicalaires de l'oxygène et des systèmes antioxydants qui les neutralisent

# **PROJET DE RECHERCHE**

## **I- HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**

Dans le modèle animal de réaction inflammatoire chez le lapin, il a été démontré *in vitro* que l'incubation d'hépatocytes provenant d'un lapin ayant une réaction inflammatoire avec du sérum provenant d'un lapin ayant une réaction inflammatoire produisait une diminution de l'activité des isoformes CYP1A2 et CYP3A6.

Il a été également démontré que cette modulation était due à des médiateurs présents dans le sérum, l'IL-6, l'IL-1 et l'IFN- $\gamma$ , qui activaient des cascades de signalisation culminant avec l'inactivation et la diminution de l'expression des isoformes CYP1A2 et CYP3A6 du cytochrome P450. L'incubation d'hépatocytes provenant d'un lapin ayant une réaction inflammatoire avec de l'IL-6 produit également une diminution de l'activité des CYP1A2 et CYP3A6.

Comme mentionné précédemment, la présence d'antioxydants tels que le L-NAME, la N-acétylcystéine et la diméthylthiourée parvient à prévenir l'effet du sérum sur l'activité du CYP1A2 et sur la quantité de cytochrome P450 total. Par contre, la présence d'inhibiteurs d'antioxydants comme le 3-amino-1, 2,4-triazole et le diéthylthiocarbamate, accentue l'effet du sérum. De même, la présence de dérivés radicalaires de l'oxygène comme le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le NO $\cdot$  diminue l'activité du cytochrome P450 aussi bien dans des hépatocytes provenant de lapins témoins que dans ceux provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire.

Ces observations nous ont conduit à l'hypothèse suivante: les dérivés radicalaires de l'oxygène modulent l'activité des isoformes du cytochrome P450 dans les hépatocytes de lapins ayant une réaction inflammatoire.

L'objectif de ce projet de recherche était de confirmer la présence de dérivés radicalaires de l'oxygène dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire par une mesure directe et d'identifier la (les) source(s) de ces dérivés radicalaires.

Nous avons donc voulu inhiber les sources principales de dérivés radicalaires de l'oxygène à savoir les mitochondries et la NADPH oxydase et nous avons examiné si l'inhibition de ces sources pouvait prévenir la baisse d'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 produite par le sérum et l'IL-6 (Figure 8).

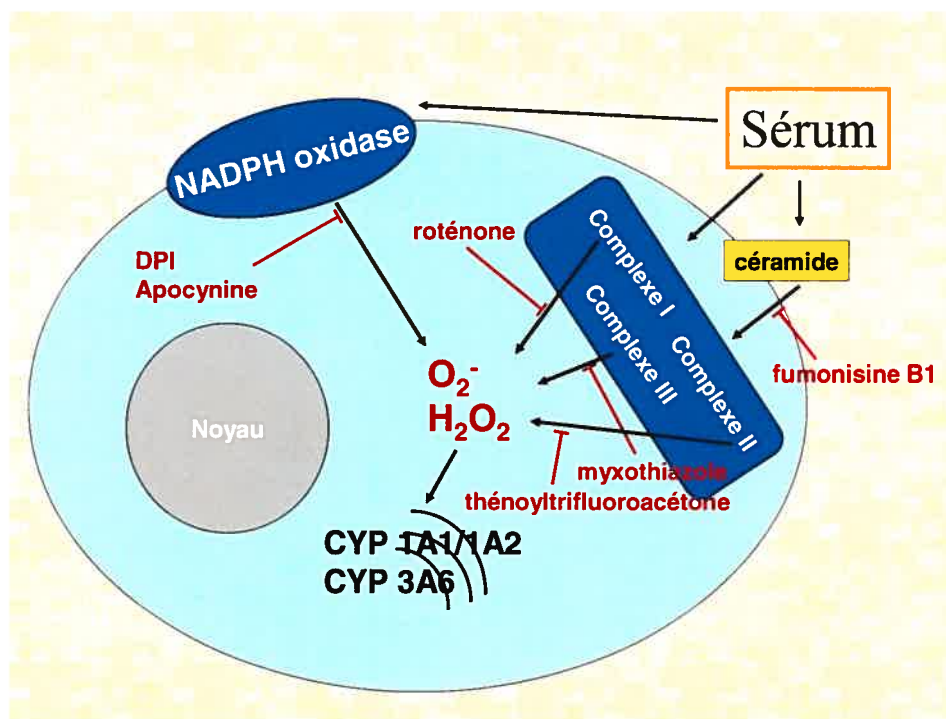


Figure 8. Inhibiteurs utilisés pour prévenir la formation de dérivés radicalaires de l'oxygène dans les hépatocytes

Les complexes I, II et III des mitochondries ont été inhibés avec la roténone, le thényltrifluoroacétone (TTFA) et le myxothiazole respectivement. Nous avons également inhibé la sphingomyélinase, l'enzyme qui catalyse la synthèse de céramide, en utilisant la fumonisine B1. En effet, la céramide stimule la production de dérivés radicalaires de l'oxygène par les mitochondries (Corda et coll., 2001). La NADPH oxydase a été inhibée avec de l'apocynine. Enfin, nous avons utilisé un inhibiteur non spécifique de flavoprotéines, le diphénylèneiodonium chloride (DPI) qui inhibe entre autres le complexe I des mitochondries, la NADPH oxydase ainsi que l'enzyme NADPH réductase (Li et Trush, 1998).

Nous avons examiné l'effet de chacun de ces produits sur les quantités de  $H_2O_2$  et de  $NO\cdot$  produites dans des hépatocytes provenant de lapins témoins et dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire. Nous avons ensuite mesuré l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 en leur présence.

Nous avons ensuite examiné si la diminution d'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 produite par le sérum et l'IL-6 était associée à des changements dans les concentrations de  $H_2O_2$  et de  $NO\cdot$ . Nous avons donc mesuré l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 ainsi que les concentrations de  $H_2O_2$  et de  $NO\cdot$  dans des hépatocytes incubés avec du sérum ou avec de l'IL-6.

## **II- MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **1- Induction de la réaction inflammatoire et isolation des hépatocytes**

Des lapins mâles de race 'New-Zealand' (2-2,5 kg) ont été obtenus de la ferme Charles River (Saint-Constant, Québec). Après avoir été maintenus dans des cages séparées et nourris pendant au moins 7 jours, certains animaux ont reçu une injection sous-cutanée de térébenthine (2,5 ml des deux cotés du dos). Quarante-huit heures après, ils présentaient une réaction inflammatoire aiguë caractérisée par une augmentation de la température corporelle, une perte de poids et une diminution de l'appétit. La température corporelle était de  $40,4 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$  pour les lapins ayant reçu de la térébenthine, comparé à  $38,3 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$  pour les lapins témoins.

Quarante-huit heures après l'injection de térébenthine, environ 30 ml de sang sont prélevés dans l'artère centrale de l'oreille. Les hépatocytes sont ensuite isolés par une méthode de perfusion du foie à deux étapes. Après avoir anesthésié les lapins avec 30 ml/kg de pentobarbital et dégagé l'abdomen grâce à une laparotomie, la veine porte qui amène le sang au foie et la veine cave hépatique d'où ressort ce sang sont cathétérisées. Le foie est perfusé premièrement avec 800 ml d'une solution de lavage contenant 115 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM de HEPES, 0,5 mM d'EGTA, 5,5 mM de glucose et 56,8 mg/ml d'héparine. Lors de la deuxième étape de la perfusion, le foie est perfusé avec une solution de 400 ml de collagénase à 0.013% servant à digérer les cellules et contenant 115 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM de HEPES, 5,5 mM de glucose, 56,8 mg/ml d'héparine, 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  et 0,025 mM d'inhibiteur de trypsine. Les perfusions sont faites à l'aide d'une pompe péristaltique et les solutions sont maintenues à  $37^{\circ}\text{C}$  et saturées d'oxygène ( $\text{O}_2$ ) à 95%.

Lorsque le foie est suffisamment digéré, au point où le liquide perfusé parvient à diffuser en dehors du foie, les cellules sont séparées en peignant le foie avec un peigne en plastique. Le mélange obtenu est filtré à travers une membrane en nylon d'un diamètre de 230  $\mu\text{m}$  et est laissé à barboter à 37°C avec de l'oxygène pendant 15 minutes. Les cellules sont alors filtrées une seconde fois à travers un filtre de nylon de 80  $\mu\text{m}$ . Puis, la suspension d'hépatocytes est divisée en quatre parties égales et mise sur de la glace pilée à 4°C. Un volume égal de milieu de culture est ajouté à chaque tube et ceux-ci sont centrifugés à 120 x g pendant trois minutes. Le surnageant est ensuite aspiré, le culot re-suspendu dans du milieu de culture et les hépatocytes sont centrifugés pendant trois minutes à 120 x g. Ce processus est répété à deux reprises.

Après les centrifugations, les hépatocytes morts sont séparés des vivants par une centrifugation dans un gradient de Percoll à 1300 x g pendant vingt minutes. La viabilité des cellules est déterminée par séparation au bleu de trypan. Seuls les échantillons dont la viabilité est supérieure à 90% sont utilisés.

Les hépatocytes sont ensuite dilués à une concentration de  $10^6$  cellules/ml dans du milieu de culture Williams Medium E (WME) auquel est rajouté 10% de sérum de veau et 1% de streptomycine/pénicilline. Les hépatocytes sont mis en culture et déposés dans différentes plaques selon les mesures qui vont être effectuées. Les hépatocytes utilisés pour les analyses d'expression du cytochrome P450 et de concentration de  $\text{NO}^{\cdot}$  sont déposés dans des plaques à 6 puits traitées au collagène à raison de  $3 \times 10^6$  cellules par puits. Pour les mesures d'activité enzymatique,  $0,5 \times 10^6$  cellules par puits sont déposées dans des plaques à 24 puits traitées au collagène. Pour les mesures de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , les hépatocytes sont dilués à une concentration de  $10^5$  cellules/ml dans du milieu de culture

Williams Medium E (WME) auquel est rajouté 10% de sérum de veau et 1% de streptomycine/pénicilline. Puis, 10000 cellules par puits sont déposées dans des plaques à 96 puits.

## 2- Inhibition des sources de dérivés radicalaires de l'oxygène

### 2.1 Détermination de la concentration des inhibiteurs

Nous avons mesuré l'activité du CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapins témoins, après quatre heures d'incubation, avec différentes concentrations de nos inhibiteurs. A partir des courbes doses-réponses obtenues ainsi que des données présentes dans la littérature (Coulom et Birmann, 2004; Matsuno-Yagi et Hatefi, 2001; Machida et coll., 1998; Le Stunff et coll., 2002, Brar et coll., 1999; Liu et Folz, 2004)), nous avons choisi les concentrations à utiliser pour le restant de nos expériences (Figure 9).

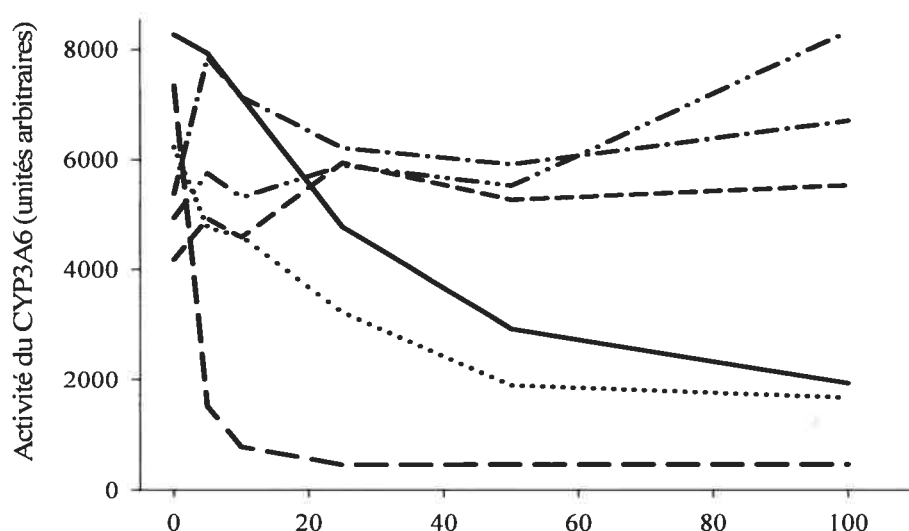


Figure 9. Activité du CYP3A6 en fonction de différentes concentrations de roténone (trait continu), de myxothiazole (· · ·) de TTFA (— —) de fumonisin B1 (— · · —) de DPI (— —) et d'apocynine (— · —). Les concentrations de myxothiazole sont sur une échelle de 0 à 10. Concentrations en μM



## 2.2 Protocole

Nous avons inhibé les complexes I, II et III des mitochondries avec de la roténone (25  $\mu\text{M}$ ), du thényltrifluoroacétone ou TTFA (25  $\mu\text{M}$ ) et du myxothiazole (4  $\mu\text{M}$ ) respectivement. Nous avons également inhibé la synthèse de céramide avec de la fumonisine B1 (25  $\mu\text{M}$ ). Ce produit inhibe la sphingomyélinase qui synthétise la céramide à partir de sphingomyéline. Enfin, nous avons inhibé la NADPH oxydase à l'aide de deux inhibiteurs : le chlorure de diphénylèneiodonium ou DPI (25  $\mu\text{M}$ ), un inhibiteur non spécifique de flavoprotéines et l'apocynine, un inhibiteur spécifique (25  $\mu\text{M}$ ).

Une fois les hépatocytes mis dans les plaques, ils reposent pendant 1 heure dans un incubateur à 37°C saturé de 95% d'air. Puis, le surnageant est aspiré et remplacé par 2 ml de WME frais dans les plaques à 6 puits, et par 300  $\mu\text{L}$  de WME dans les plaques à 24 puits. Les différents inhibiteurs sont ensuite ajoutés et incubés avec les hépatocytes pendant une autre heure. Le sérum de lapin (rajouté à 10% du volume total, soit 200  $\mu\text{l}$  par puits dans les plaques à 6 puits et 30  $\mu\text{l}$  par puits dans les plaques à 24 puits) ou l'IL-6 humain recombiné (10 ng/ml par puits) sont alors ajoutés pour une incubation de quatre heures.

Pour les plaques à 96 puits destinées à la mesure de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , les inhibiteurs sont rajoutés directement après l'ajout des hépatocytes dans les plaques, incubés pendant 1 heure, puis le sérum (10  $\mu\text{l}$  par puits) et l'IL-6 (10 ng/ml par puits) sont rajoutés. Après quatre heures d'incubation, les différents paramètres sont mesurés.

La roténone et le TTFA sont dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et gardés dans des aliquotes d'une solution mère de 5 mM à -20°C. Le myxothiazole est dilué dans

du DMSO et conservé en aliquotes d'une solution mère de 2 mM à 2°C. La fumonisine B1 et le DPI sont dilués dans du DMSO et conservés en aliquotes d'une solution mère de 10 mM à 2°C et à -20°C respectivement. L'apocynine est diluée dans du méthanol et conservé en aliquotes d'une solution mère de 10 mM à -20°C.

### **3- Préparation du sérum et de l'interleukine-6**

Environ 30 ml de sang sont pris de chaque lapin avant la chirurgie. Les échantillons de sang reposent à température de la pièce pendant 2 heures, le temps de coaguler. Ils sont ensuite divisés en aliquotes de 1 ml et immédiatement congelés à -80°C. Les médiateurs sériques peuvent conserver leur activité pendant au moins un an (Levitchi et coll., 2004).

L'interleukine-6 humaine recombinée est diluée dans du tampon phosphate (PBS) 1X contenant 0,1% d'albumine de sérum bovin. Cette solution d'une concentration de 1 µg/ml est ensuite conservée en aliquotes à -20°C jusqu'à utilisation.

### **4- Mesure de la production de peroxyde d'hydrogène**

#### **4.1 Principes d'utilisation de la sonde**

Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est mesuré à l'aide d'une sonde, la diacétate de 2',7'dichlorofluorescéine (DCFH-DA). Cette molécule non fluorescente pénètre les cellules où elle va être hydrolysée par des estérases intracellulaires pour donner un autre composé non fluorescent le DCFH qui ne peut pas sortir des cellules. En présence de dérivés radicalaires de l'oxygène, en particulier du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le DCFH va être oxydé pour former la 2',7'dichlorofluorescéine (DCF), une molécule très fluorescente. La fluorescence du DCF

est donc utilisée pour refléter la quantité de  $H_2O_2$  produite dans la cellule (Keston et coll., 1965; Le Bel et coll., 1992).

Afin de déterminer si notre sonde réagissait bien avec le  $H_2O_2$ , nous l'avons incubée avec des quantités croissantes de  $H_2O_2$  et mesuré la fluorescence du DCF en absence d'hépatocytes. Comme contrôle, la sonde a été incubée avec ou sans eau, le véhicule dans lequel le  $H_2O_2$  est dilué. Les résultats obtenus confirment que la fluorescence de la sonde augmente avec la concentration de  $H_2O_2$  présente (Figure10).

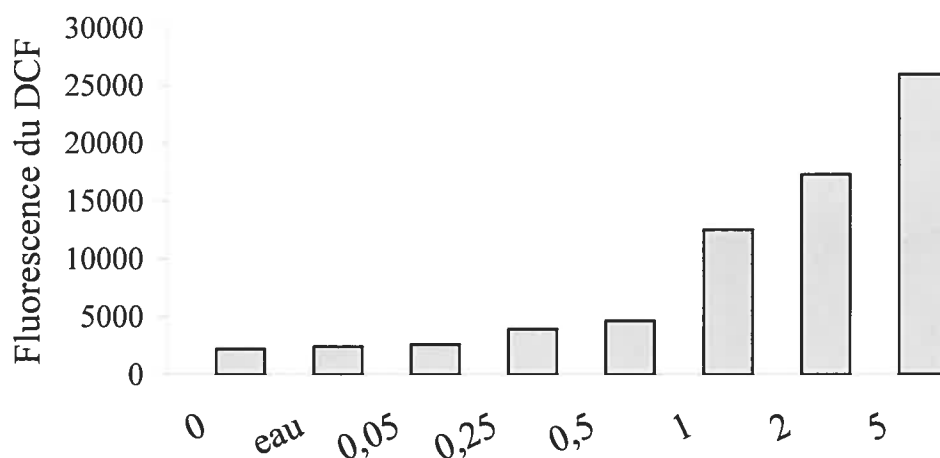


Figure 10. Fluorescence de la dichlorofluorescéine (DCF) en fonction de concentrations croissantes de  $H_2O_2$  en absence de cellules (concentrations en mM)

## 4.2 Protocole

A la fin des quatre heures d'incubation, le surnageant est aspiré et remplacé par 100  $\mu\text{L}$  de DCFH-DA par puit, dilué dans une solution de Krebs à une concentration finale de 100  $\mu\text{M}$ . Après 10 minutes d'incubation, la sonde est aspirée et remplacée par une solution de Krebs fraîche. La plaque est alors lue par fluorométrie (excitation de 485 nm et émission de 535 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques fluorescent (Victor2, 1420 Multilabel counter, PerkinElmer Wallac, Gaithersburg, MD) (Wang et Joseph, 1999). Le DCFH-DA est dilué dans du DMSO et conservé en aliquotes d'une solution mère de 5 mM à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5- Mesure de la production de monoxyde d'azote ( $\text{NO}^{\cdot}$ )

### 5.1 Principes de la réaction

Dans une solution aqueuse, le  $\text{NO}^{\cdot}$  se dégrade rapidement. Les deux produits les plus stables de cette dégradation sont le nitrate et le nitrite. Ainsi, la concentration de  $\text{NO}^{\cdot}$  relâché dans le milieu de culture peut être évaluée en mesurant l'accumulation de ces deux produits. Le ratio nitrite/nitrate est très variable et dépend des voies de dégradation. Pour avoir une mesure précise de la concentration de  $\text{NO}^{\cdot}$ , il faut donc quantifier ces deux produits. Pour ce faire, nous avons réduit en nitrite, le nitrate présent dans le milieu en utilisant la nitrate réductase; puis nous avons mesuré la quantité totale de nitrite en utilisant le réactif de Griess. Ce réactif est en fait composé de deux produits; le N-(1-naphthyl)éthylènediamine (N-NEDA) et la sulfanilamide.

La sulfanilamide va réagir avec le nitrite pour former le diazonium. Le diazonium va ensuite se lier au deuxième réactif, le N-NEDA pour former un colorant mesurable par spectrophotométrie à une absorbance de 540nm.

## 5.2 Protocole

Après quatre heures d'incubation, le surnageant des plaques à 6 puits est aspiré et congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Au moment de la mesure, les surnageants sont décongelés et centrifugés à  $1000 \times g$  pour enlever les restes de cellules et autres débris et des échantillons de  $145 \mu\text{L}$  sont prélevés pour la réaction.

Pour chaque échantillon, le nitrate est réduit en nitrite en incubant les cellules pendant quinze minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  en présence de  $0,1$  unités/mL de nitrate réductase, de  $50 \mu\text{M}$  de NADPH et de  $5 \mu\text{M}$  de FAD. Après la réduction, la NADPH est oxydée pour éviter une interférence lors de l'évaluation du nitrite. L'oxydation se fait en incubant les échantillons pendant cinq minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  avec  $10$  unités/mL de lactate déshydrogénase et  $10 \text{ mM}$  de pyruvate de sodium. La réaction de Griess peut alors se réaliser. Les échantillons sont mis sur la glace et  $1 \text{ mM}$  de sulfanilamide puis  $0,1 \text{ M}$  de HCl sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite centrifugés à  $1000 \times g$  pendant  $15 \text{ min}$  à  $4^{\circ}\text{C}$  puis,  $150 \mu\text{L}$  du surnageant est prélevé et transféré dans des microplaques à 96 puits.  $10 \mu\text{L}$  de N-NEDA sont alors ajoutés à chaque puit et la plaque est incubée pendant  $10 \text{ min}$  à température de la pièce avant d'être lue. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de  $540 \text{ nm}$  à l'aide d'un lecteur de microplaques (Victor2, 1420 Multilabel counter, PerkinElmer Wallac, Gaithesburg, MD). L'absorbance est comparée à une courbe

standard de concentration de nitrite/nitrate et d'absorbances. Les concentrations de nitrite reflétant les concentrations de NO<sup>-</sup> total, les résultats sont exprimés en  $\mu\text{M}$  de NO<sup>-</sup>.

#### **6- Mesure de l'activité du CYP1A2**

Après l'incubation, le surnageant des hépatocytes est aspiré et ces hépatocytes sont rincés deux fois avec 300  $\mu\text{L}$  d'une solution de Krebs. Dans chaque puit est ensuite déposé 300  $\mu\text{L}$  de 3,3 mM de méthoxyrésorufine (MROD) dilué dans du Krebs. Le CYP1A2, par une réaction de O-déméthylation, va transformer le MROD en résorufine, un composé fluorescent. L'activité du CYP1A2 est donc mesurée en observant la fluorescence de la résorufine (Kourylko et coll., 2006). Après 10 min d'incubation avec le MROD, 100  $\mu\text{L}$  de surnageant sont prélevés des puits et transférés dans une plaque de fluorescence à 96 puits contenant 67  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acide perchlorique/glycine (0,25M/0,75M) et 33  $\mu\text{L}$  d'une solution de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  à 5,4 %. La fluorescence de la résorufine est mesurée par fluorométrie (excitation de 530 nm et émission de 584 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques à fluorescence (Victor2, 1420 Multilabel counter, PerkinElmer Wallac, Gaithersburg, MD). Le MROD est dilué dans du DMSO et conservé en aliquotes d'une solution mère de 4,4 mM à 2°C.

#### **7- Mesure de l'activité du CYP3A6**

L'activité du CYP3A6 est mesurée selon le même principe que celle du CYP1A2. Dans ce cas, la sonde utilisée est le 3,4-difluorobenzoyloxy-5,5-diméthyl-4-(4-méthylsulfonyl phényl)-(5H)-furan-2-one (DFB). Le DFB, un substrat du CYP3A6 non fluorescent est transformé en 3-hydroxy-4-(4-méthylsulfonyl phényl)-(5H)-furan-2-one

(DFH), un métabolite fluorescent (Chauret et coll. 1999). Après le rinçage avec du Krebs, 300  $\mu$ L de DFB dilué dans du Krebs à une concentration de 60  $\mu$ M sont déposés dans les puits. Au bout de 20 minutes d'incubation, 100  $\mu$ L de surnageant sont prélevés et transférés dans une plaque de fluorescence à 96 puits contenant 100  $\mu$ L d'une solution de tampon tris/acétonitrile (0,05M/40%). La fluorescence du DFB est mesurée par fluorométrie (excitation de 360 nm et émission de 440 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques à fluorescence (Victor2, 1420 Multilabel counter, PerkinElmer Wallac, Gaithesburg, MD). Le DFB est dilué dans de l'acétonitrile et conservé dans une solution mère de 10 mM à 2°C.

### **8- Expression des CYP1A2 et CYP3A6**

L'expression des isoformes CYP1A2 et CYP3A6 a été mesurée par immunobuvardage de type western (Western blot). Après incubation, les hépatocytes sont instantanément gelés par immersion dans de l'azote liquide et conservées à -80°C. Le jour de l'analyse, la concentration de protéine dans les échantillons est évaluée par la technique du BCA. Selon cette méthode, l'acide bicinchoninique (BCA) réagit avec les complexes formés par les liens peptidiques et les ions cuivre pour donner un produit coloré qui absorbe la lumière. La quantité de protéine en solution peut alors être quantifiée en mesurant le spectre d'absorbance de la solution (Stoscheck, 1990). Quarante-vingt  $\mu$ g de protéines de chaque échantillon sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de sodium dodécyl sulfate/ polyacrylamide (7,5% polyacrylamide). Ces protéines sont ensuite transférées pendant 1 heure sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un

système de transfert électrophorétique (Mini-trans-blot electrophoretic transfer system, Biorad, Hercules, CA, USA).

Les CYP1A1 et 1A2 ont été détectés à l'aide d'un anticorps primaire polyclonal anti-CYP1A1 de lapin produit par la chèvre: la membrane a été incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire à une dilution de 1 :100 dans du tampon de blocage (5% de lait en poudre dans du tampon de phosphate). Les protéines ont pu être détectées grâce à un anticorps secondaire anti-chèvre conjugué à la phosphatase alcaline. La membrane a été incubée pendant une heure avec l'anticorps à une dilution de 1 :10000 dans du tampon de blocage. La visualisation à la phosphatase alcaline s'est faite en utilisant le bleu de tétrazolium comme substrat.

Le CYP3A6 a été détecté à l'aide d'un anticorps primaire monoclonal anti-CYP3A1 de rat produit par la souris qui réagit également avec le CYP3A6 : la membrane a été incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire à une dilution de 1 :250 dans du tampon de blocage. Les protéines ont pu être détectées grâce à un anticorps secondaire (IgG) anti-souris conjugué à la peroxydase. La membrane a été incubée pendant une heure avec l'anticorps à une dilution de 1 :500 dans du tampon de blocage. La chimioluminescence a été visualisée par autoradiographie.

L'intensité des bandes a été mesurée par densitométrie avec le logiciel Un-Scan-It-Gel et a été comparée en utilisant les mêmes test statistiques utilisés pour comparer l'activité des isoformes (Silk Scientific Inc., Orem, UT, USA).



## 9- Analyses statistiques

Tous les résultats sont accompagnés de l'erreur type (moyenne  $\pm$  erreur type). La comparaison entre les divers groupes expérimentaux et leur témoin a été réalisée en effectuant une analyse de variance suivie d'un test de 'Student-Newman-Keuls'. Ce test sert à effectuer des comparaisons par paires des moyennes des différences entre les réponses obtenues dans les différents groupes.

Pour comparer l'activité des isoformes, la concentration de  $H_2O_2$  et la concentration de  $NO$  basales dans des hépatocytes provenant de lapins témoins à ceux des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire, nous avons utilisé un test-t non pairé. Un test t-pairé a été utilisé pour analyser l'effet du sérum et de l'interleukine-6 sur l'activité des isoformes, sur la quantité de  $H_2O_2$  dans les hépatocytes et sur la concentration de  $NO$  dans ces cellules. Le test-t a été effectué en comparant les hépatocytes témoins aux hépatocytes incubés avec du sérum ou de l'interleukine-6. Ce test a été utilisé pour ces deux analyses car il n'y avait que deux groupes expérimentaux à comparer (témoin et inflammation ou témoin et sérum/IL-6).

Les résultats sont considérés significatifs lorsque le p est inférieur à 0.05. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SIGMA STAT.

## 10- Matériels

Le WME, le Krebs, l'EGTA, le glucose, le collagène de type I, l'héparine, l'inhibiteur de trypsine, le gradient de Percoll, le peroxyde d'hydrogène, le SB203580, la roténone, le myxothiazole, la fumonisine B1, le DPI, l'apocynine, le TTFA, l'IL-6 humain recombiné, le DCFH-DA, l'HEPES, la glycine, le tampon tris, le MROD, la

sulfanilamide et le N-NEDA ont tous été obtenus chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Le NaCl, le KCl, le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , le  $\text{CaCl}_2$ , le pyruvate de sodium, l'acétonitrile, le méthanol, le DMSO et les plaques de cultures à 6, 24 et 96 puits ont été achetés chez Fisher Scientific Canada (Ottawa, ON, Canada). Le sérum de veau et la pénicilline/streptomycine proviennent de chez Gibco (Invitrogen cell culture, Burlington, ON, Canada). La collagénase de type IV a été achetée chez Worthington Biochemicals (Lakewood, NJ, USA). La térébenthine provient de chez Recochem (Montréal, QC, Canada). Le DFB et le DFH ont été généreusement donnés par Merck Frost Canada (Kirkland, QC, Canada). Les anticorps polyclonaux anti-CYP1A2 de lapin produits par la chèvre ainsi que les anticorps monoclonaux anti-CYP3A1 de rat produits par la souris ont été obtenus chez Oxford Biochemical Research (Oxford, MI, USA). Les anticorps secondaires contre la chèvre ont également été obtenus chez Oxford Biochemical Research. Les anticorps secondaires contre la souris proviennent de Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). La nitrate réductase et la lactate déshydrogénase ont été obtenues chez Roche diagnostics (Mannheim, Allemagne).

### III- RÉSULTATS

#### 1- Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et activité des CYP1A2 et CYP3A6 pendant une réaction inflammatoire

La première étape de notre étude consistait à déterminer si la baisse d'activité des CYP1A2 et CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire était associée à une augmentation de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les hépatocytes. Nous avons donc comparé la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des hépatocytes de lapins témoins à la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire. Nous avons également comparé l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 dans ces deux types d'hépatocytes.

Comme indiqué dans le tableau 4, la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire est augmentée par rapport aux témoins. Parallèlement, l'activité du CYP1A2 est diminuée de 53% et celle du CYP3A6 est diminuée de 71% par rapport aux témoins.

	H <sub>cont</sub>	H <sub>infla</sub>
<b>Quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> (Unités arbitraires)	15570 ± 1195 (n=5)	25217 ± 3473* (n=5)
<b>Activité du CYP1A2</b> (Unités arbitraires)	13602 ± 1331 (n=6)	6101 ± 581* (n=11)
<b>Activité du CYP3A6</b> (Unités arbitraires)	8318 ± 582 (n=18)	2434 ± 199* (n=20)

Tableau 4. Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et activité des CYP1A2 et CYP3A6 déterminées dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>) et dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (H<sub>infla</sub>).

\*p < 0,05 comparé à H<sub>cont</sub>

## 2- Relation entre le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'activité des isoformes CYP1A2 et CYP3A6

Des études précédentes effectuées dans notre laboratoire ont démontré que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminuait la quantité de cytochrome P450 total actif mais ne donnaient pas d'information spécifique sur l'activité des isoformes CYP1A2 et CYP3A6 (El-Kadi et coll., 2000).

Nous avons donc mesuré l'activité de ces isoformes, CYP1A2 et CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapins témoins et incubés pendant quatre heures en présence de quantités croissantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nous avons parallèlement mesuré la fluorescence émise par la sonde DCFH-DA à ces concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les résultats (Figure 11), montrent que les concentrations croissantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmentent la fluorescence du DCFH-DA pour atteindre un plateau à partir de 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les activités des CYP1A2 et CYP3A6 sont représentées en pourcentage de l'activité des témoins. Les données indiquent que la présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne une diminution dose-dépendante de l'activité du CYP3A6 à des concentrations supérieures à 0.25 mM, différences qui deviennent statistiquement significatives à partir de 0.5 mM. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminue également l'activité du CYP1A2, mais à des concentrations supérieures à 1 mM. Les différences deviennent statistiquement significatives à partir de 2 mM.

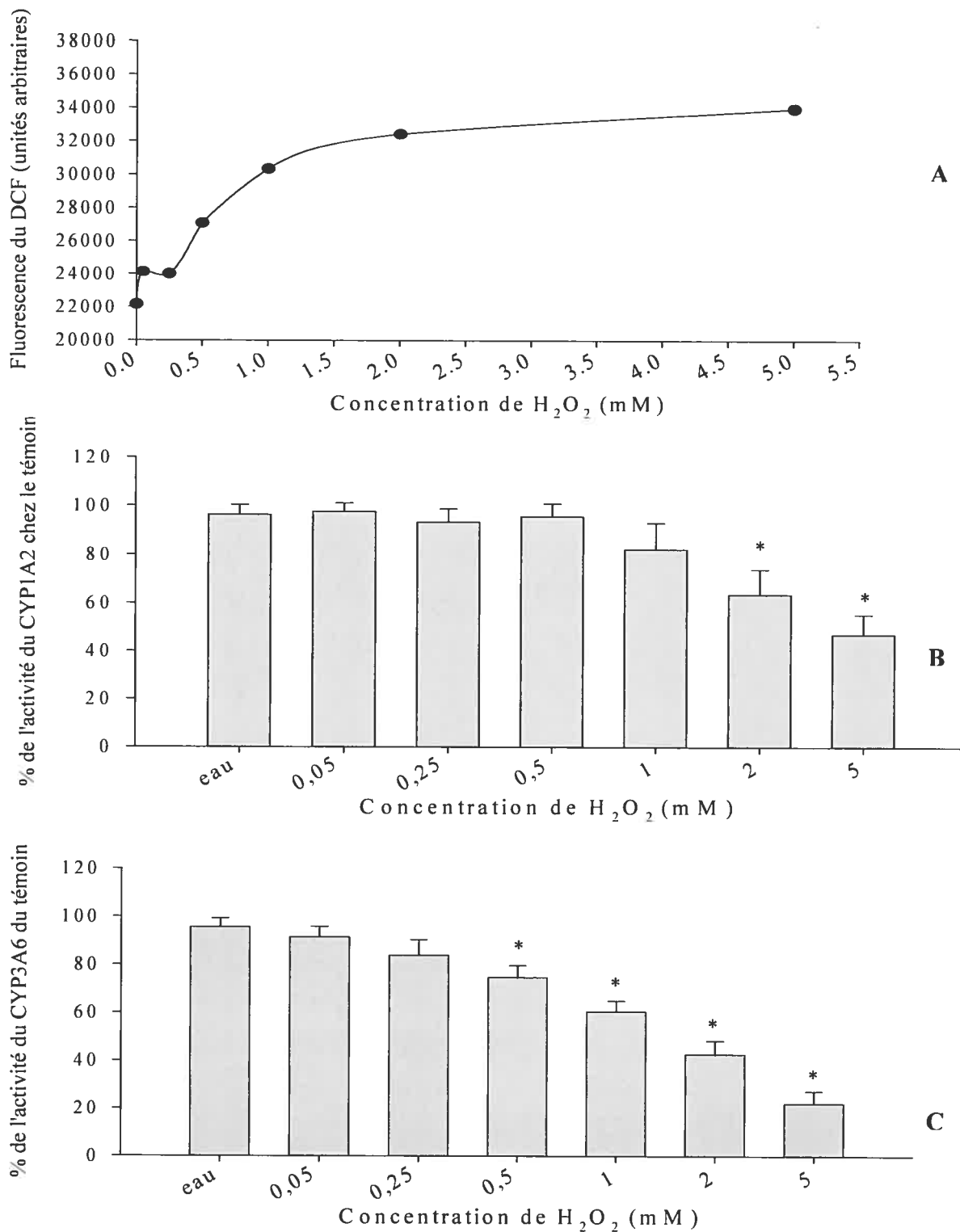


Figure 11. (A) Fluorescence du DCF en présence de concentrations croissantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des hépatocytes de lapins témoins, n = 1. (B) pourcentage de l'activité du CYP1A2 en présence de concentrations croissantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, n = 3. (C) pourcentage de l'activité du CYP3A6 en présence de concentrations croissantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, n = 6.

\*, p<0,05 comparé au témoin

### **3- Étude du rôle potentiel des dérivés radicalaires de l'oxygène dans la diminution d'activité des CYP1A2 et CYP3A6**

La réaction inflammatoire augmente la quantité de  $H_2O_2$  et diminue l'activité des isoformes CYP1A2 et CYP3A6. Afin de vérifier si ces deux phénomènes sont associés, nous avons inhibé les sources potentielles de  $H_2O_2$  dans les hépatocytes. Comme mentionné précédemment, nous avons utilisé six inhibiteurs, soit les inhibiteurs des complexes mitochondriaux I, II et III (roténone, TTFA et myxothiazole), un inhibiteur de la sphingomyélinase qui a pour effet d'inhiber la formation de la céramide (fumonisine B1), un inhibiteur de la NADPH oxydase (apocynine) et un inhibiteur non spécifique des flavoprotéines dont la NADPH oxydase (DPI).

#### **3.1 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur les concentrations de $H_2O_2$ dans les hépatocytes**

Afin de s'assurer que les inhibiteurs utilisés diminuaient la production de  $H_2O_2$ , nous avons mesuré la concentration de  $H_2O_2$  dans des hépatocytes incubés pendant quatre heures en leur présence. Nous avons également incubé les hépatocytes pendant quatre heures avec du diméthyl sulfoxyde (DMSO), le solvant utilisé pour dissoudre les inhibiteurs. Le DMSO a été utilisé à la plus forte concentration employée pour dissoudre les inhibiteurs (0.5 %). Les expériences ont été effectuées avec des hépatocytes provenant de lapins témoins et des hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire.

Les résultats montrent que l'inhibition des complexes I et III des mitochondries par la roténone et le myxothiazole respectivement diminue la quantité de  $H_2O_2$  produite par les

hépatocytes dans les hépatocytes témoins et dans ceux provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire (Figures 12 et 13). La diminution produite par le myxothiazole n'est toutefois pas significative ( $p=0,06$ ) dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire, à cause de la variabilité dans les échantillons (Figure 13). L'inhibition non spécifique des flavoprotéines par le DPI diminue également la quantité de  $H_2O_2$ . Par contre, l'apocynine, l'inhibiteur spécifique de la NADPH oxydase n'a que très peu d'effet sur la production de  $H_2O_2$  dans les deux types d'hépatocytes.

Le DMSO, le TTFA et la fumonisine B1 n'affectent pas la production de  $H_2O_2$  dans les hépatocytes provenant de lapins témoins, tout comme dans ceux provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire (Figures 12 et 13).

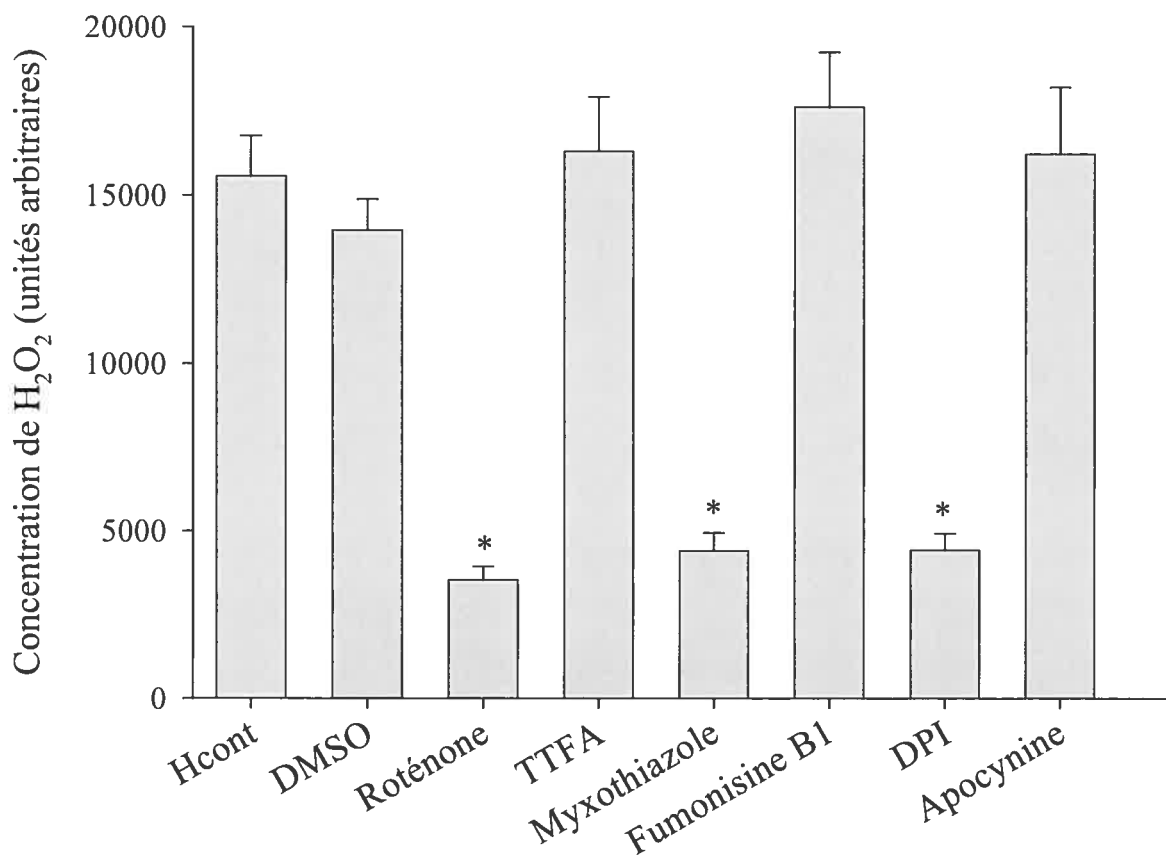


Figure 12. Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>) et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\* p<0,05 comparé au témoin, n = 5.



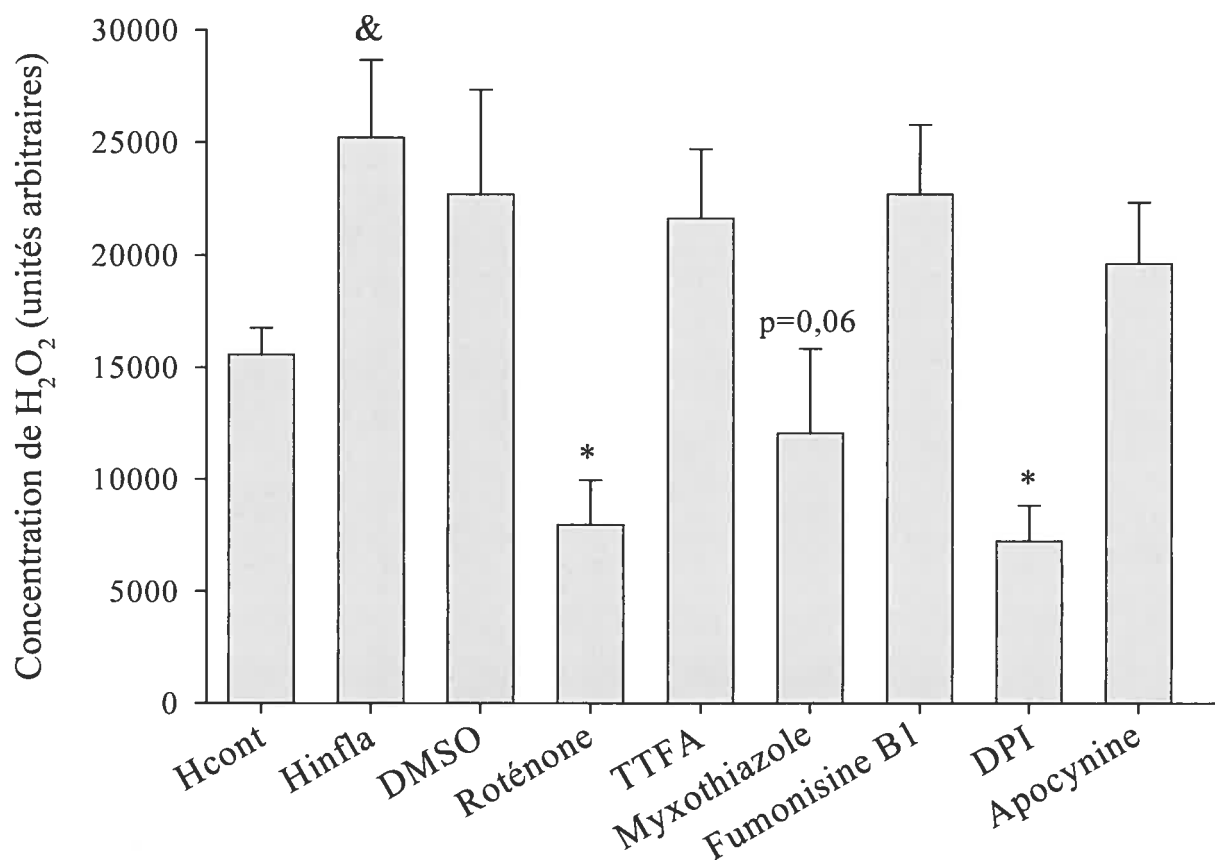


Figure 13. Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des hépatocytes provenant de lapins témoin (H<sub>cont</sub>) et de lapins avec une réaction inflammatoire (H<sub>infla</sub>), incubés avec de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\* p<0,05 comparé à H<sub>infla</sub>, & p<0,05 comparé à H<sub>cont</sub>, n = 5

### **3.2 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'activité du CYP1A2**

Nous avons étudié l'effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'activité du CYP1A2. Nous avons étudié les effets obtenus avec des hépatocytes provenant de lapins témoins ainsi que les effets obtenus avec des hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire.

Après quatre heures d'incubation avec des hépatocytes provenant de lapins témoins (Figure 14B), la fumonisine B1 augmente l'activité du CYP1A2 de 32% ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin. Par contre, la présence de myxothiazole et de DPI entraîne une diminution importante de l'activité du CYP1A2 de 54% et de 73% ( $p < 0,05$ ) respectivement, par rapport à l'activité du témoin.

Dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (Figure 15B), le myxothiazole et le DPI entraînent également une diminution de l'activité du CYP1A2 de 28% et de 34% respectivement ( $p < 0,05$ ). La fumonisine B1 n'augmente pas significativement l'activité du CYP1A2.

Le DMSO, la roténone, le TTFA et l'apocynine n'affectent pas l'activité du CYP1A2 dans des hépatocytes provenant de lapins témoins et dans ceux provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (Figures 14B et 15B).

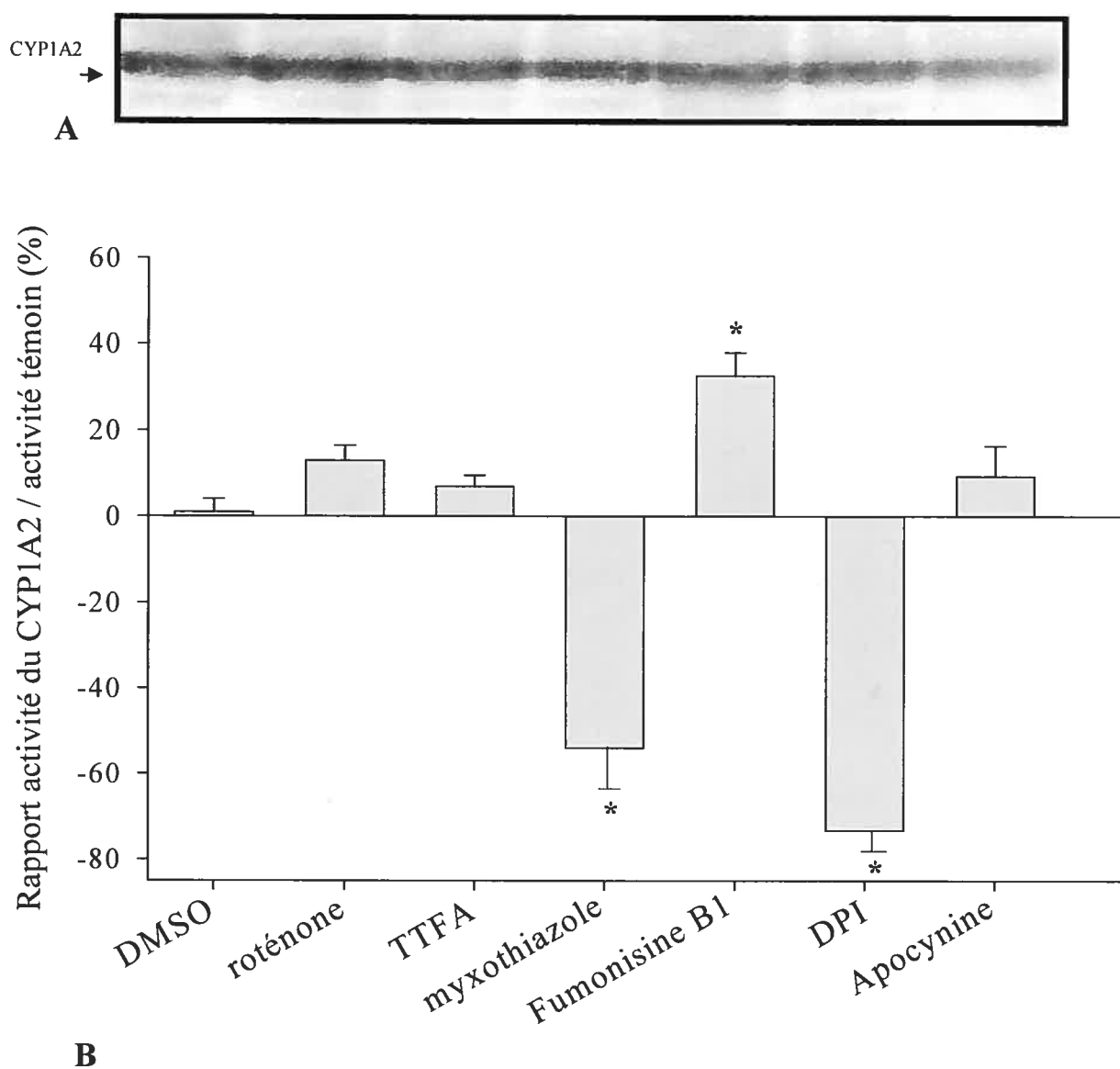


Figure 14. Expression (A) et changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin) (B), dans des hépatocytes provenant de lapins témoins et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\*  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 6$

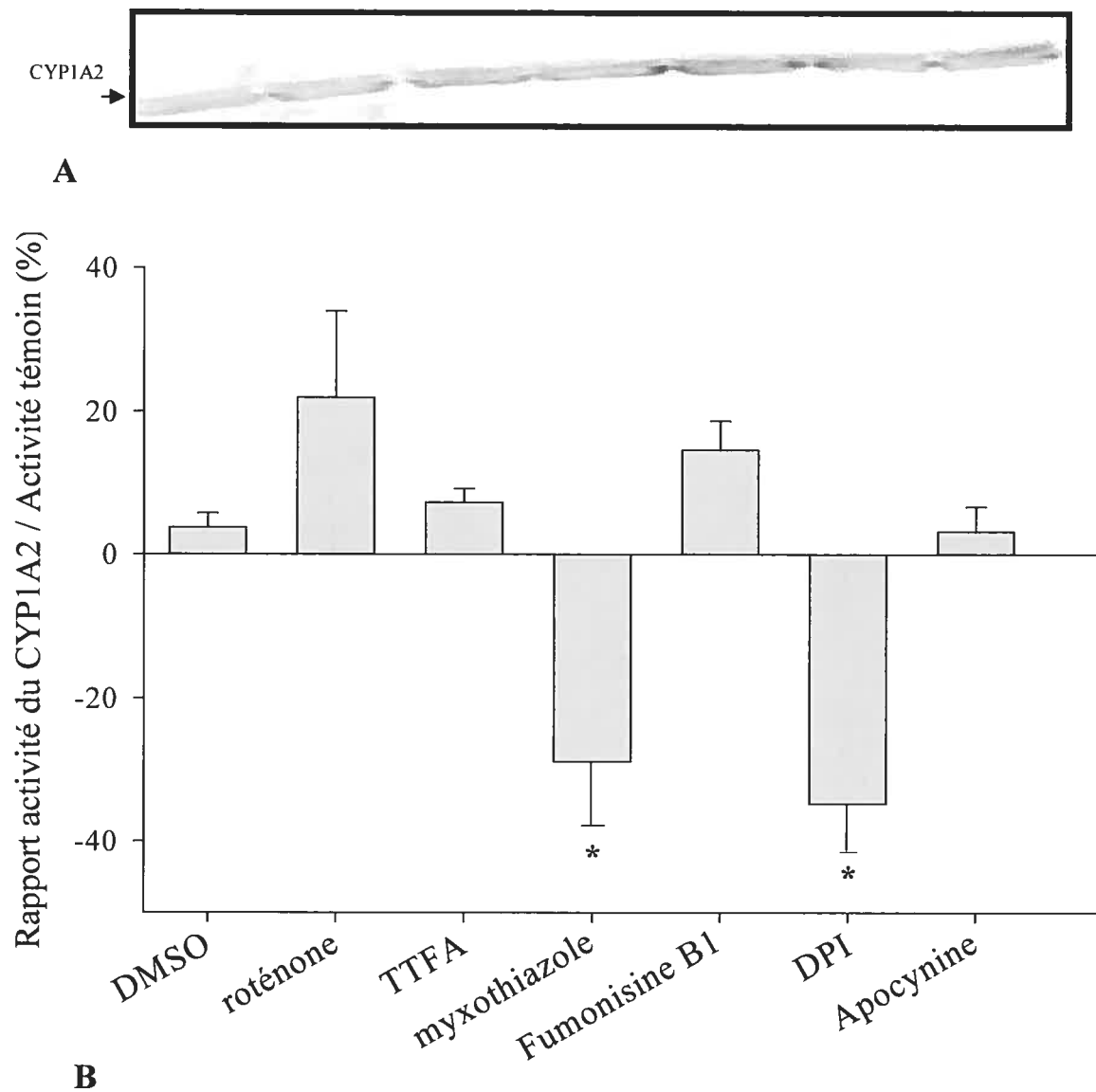


Figure 15. Expression (A) et changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\*  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 11$

DPI et de l'apocynine sur l'activité du CYP3A6

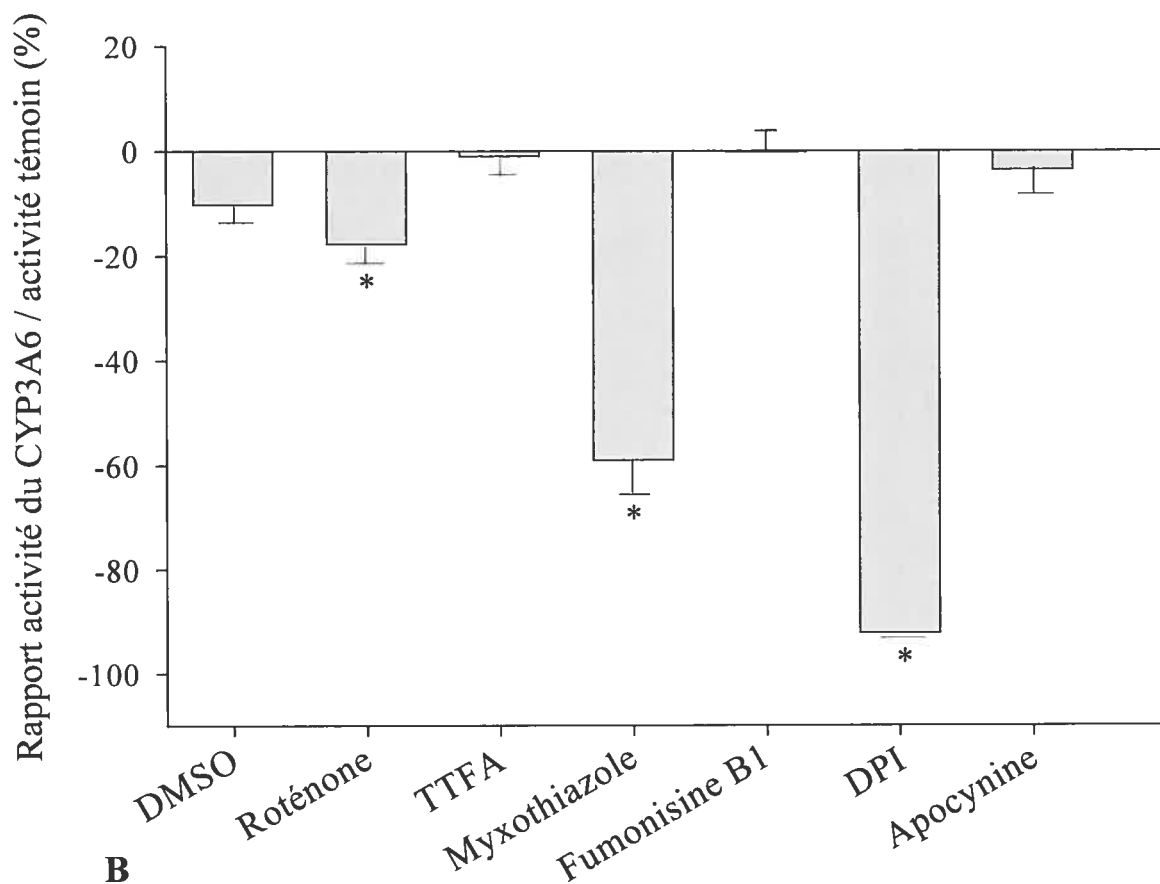
Contrairement à l'activité CYP1A2 qui n'était pas affectée par la présence de roténone, l'activité du CYP3A6 est diminuée par la roténone et comme pour le CYP1A2, par le myxothiazole et le DPI dans les hépatocytes provenant de lapins témoins de même que dans les hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire (Figures 16B et 17B).

Dans des hépatocytes provenant de lapins témoins, la diminution d'activité du CYP3A6 produite par la roténone est de 17% comparé à 59% et 92% de diminution produites par le myxothiazole et le DPI, respectivement. Dans les hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire, la diminution induite par la roténone est de 34% comparé à des diminutions de 60% et de 76% produites par le myxothiazole et le DPI.

Le DMSO, la TTFA, la fumonisine B1 et l'apocynine n'affectent pas l'activité du CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapins témoins ni dans des hépatocytes de lapins avec une réaction inflammatoire (Figures 16B et 17B).



A



B

Figure 16. Expression (A) et changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin) (B), dans des hépatocytes procédant de lapins témoins et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\*  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 18$ .

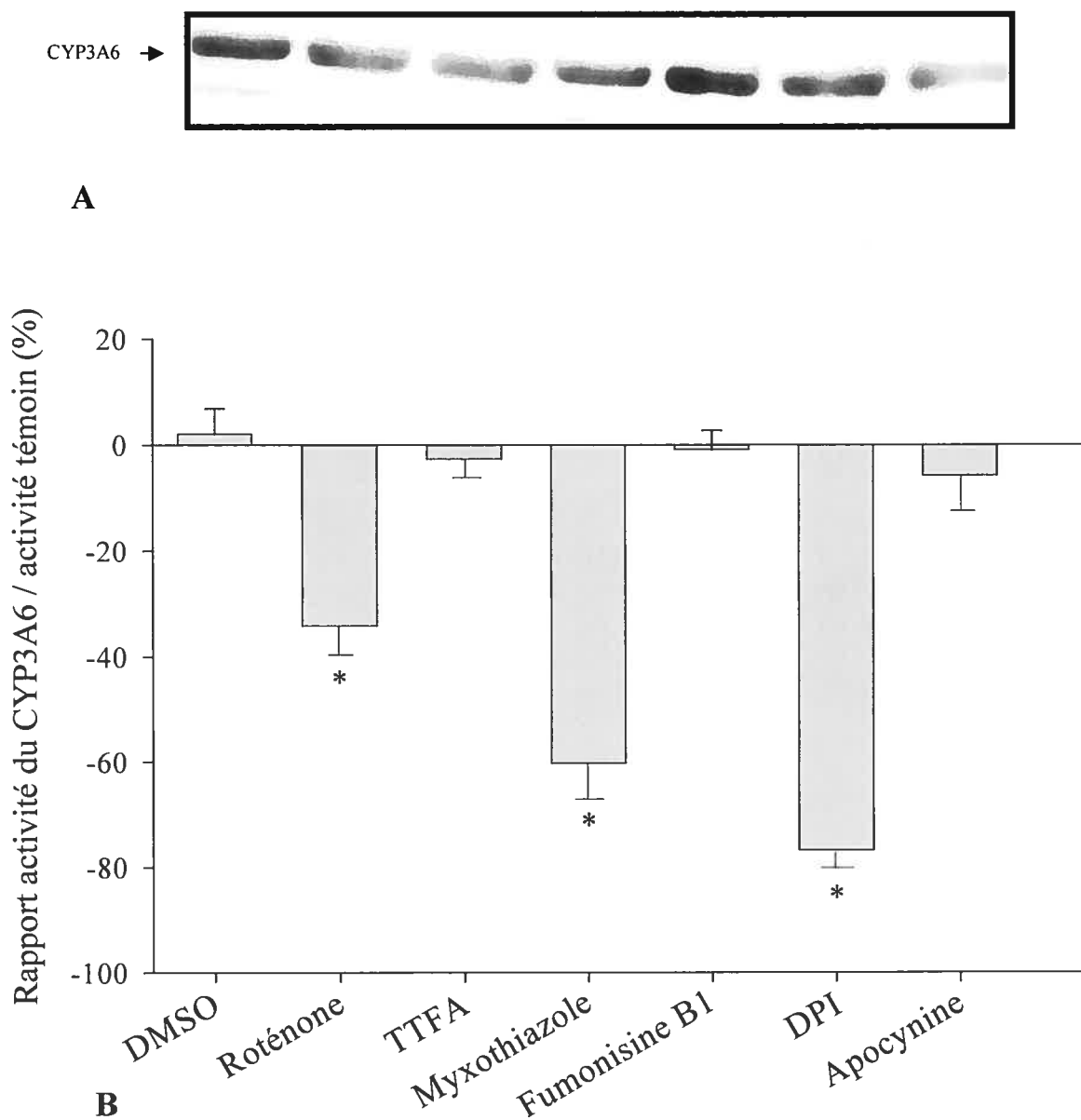


Figure 17. Expression (A) et changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin) (B), dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\*  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 20$ .

### **3.4 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'expression du CYP1A2 et du CYP3A6**

Nous avons mesuré l'expression des protéines CYP1A2 et CYP3A6 dans les hépatocytes incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine, afin de s'assurer que les changements d'activité des CYP1A2 et le CYP3A6 observés en présence de ces produits sont dûs à des modifications dans l'activité catalytique des enzymes et non à des changements de l'expression des protéines.

Les analyses par immunobuvardage de type western (Figures 14A, 15A, 16A et 17A) indiquent que la présence de DMSO, de roténone, de TTFA, de myxothiazole, de fumonisine B1, de DPI et d'apocynine n'affecte pas l'expression des CYP1A2 et CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapins témoins et dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire.



#### 4- Effet du sérum d'un lapin avec une réaction inflammatoire sur l'activité des CYP1A2 et CYP3A6

Suite à quatre heures d'incubation des hépatocytes de lapins ayant une réaction inflammatoire avec du sérum d'un lapin ayant une réaction inflammatoire, nous observons une diminution de l'activité des CYP1A2 et CYP3A6 d'environ 14 % ( $p < 0,05$ ). Dans les hépatocytes provenant de lapins témoins, la présence de sérum n'a pas d'incidence significative sur l'activité de ces enzymes (Tableau 5).

<b>CYP1A2</b>		
	Témoin	Témoin + S <sub>infla</sub>
<b>H<sub>cont</sub></b>	14122 ± 1616 (n=6)	14354 ± 2144 (n=6)
<b>H<sub>infla</sub></b>	7139 ± 605 (n=9)	6167 ± 548* (n=9)
<b>CYP3A6</b>		
	Témoin	Témoin + S <sub>infla</sub>
<b>H<sub>cont</sub></b>	8973 ± 1377 (n=5)	8467 ± 1440 (n=5)
<b>H<sub>infla</sub></b>	2614 ± 238 (n=14)	2218 ± 214* (n=14)

Tableau 5. Activités du CYP1A2 et du CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>) et de lapins avec une réaction inflammatoire (H<sub>infla</sub>), en présence ou en absence de sérum d'un lapin ayant une réaction inflammatoire (témoin ou +S<sub>infla</sub>).

\*  $p < 0,05$  comparé au témoin

#### **4.1 Effet du sérum d'un lapin avec une réaction inflammatoire sur les concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Afin de déterminer si la baisse d'activité des CYP1A2 et CYP3A6 produite par le sérum était associée à un changement dans la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous avons mesuré la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des hépatocytes incubés pendant quatre heures avec du sérum. Nous avons également étudié l'effet du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de sérum.

Les résultats indiquent que l'incubation des hépatocytes avec du sérum n'affecte pas la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les hépatocytes témoins ni dans les hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (Figures 18 et 19). Dans ces deux sortes d'hépatocytes, l'inhibition du complexe I par la roténone, l'inhibition du complexe III par le myxothiazole et l'inhibition de flavoprotéines par le DPI continuent de diminuer la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figures 18 et 19).

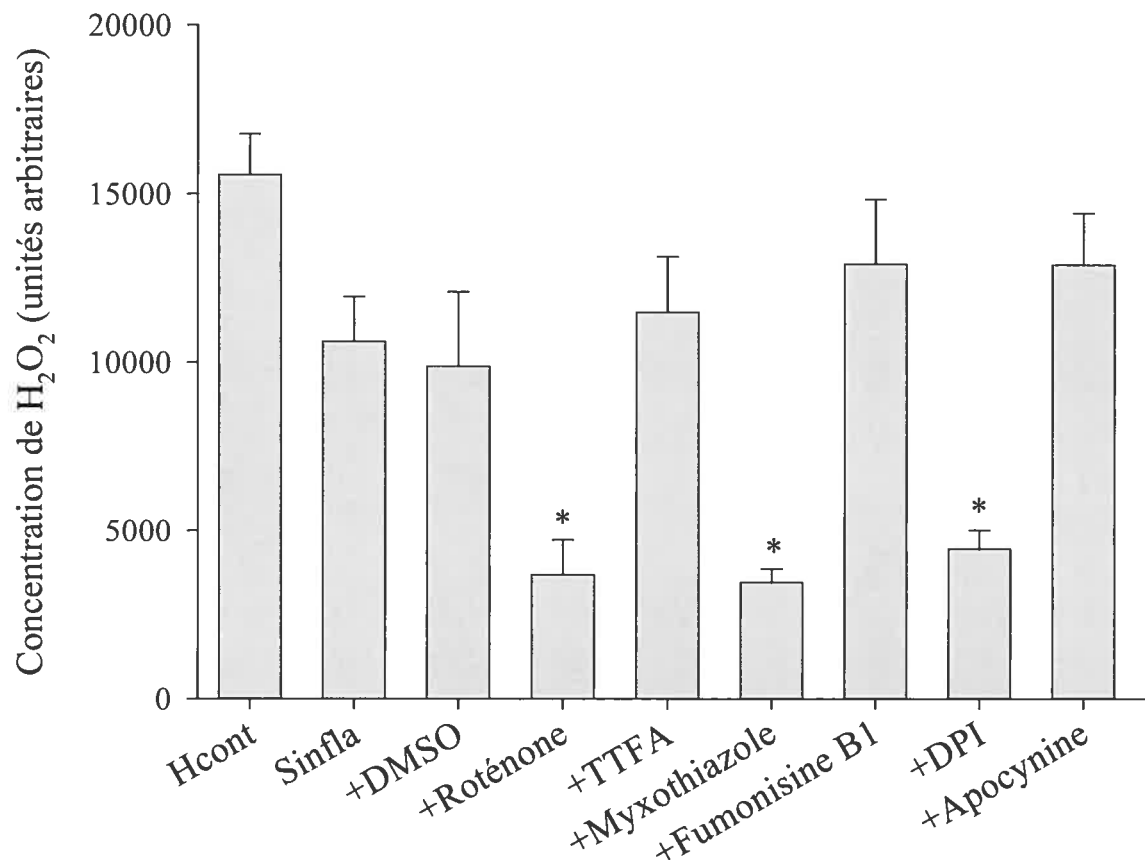


Figure 18. Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>), incubés avec du sérum (S<sub>infla</sub>) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\* p<0,05 comparé à S<sub>infla</sub>, n = 5

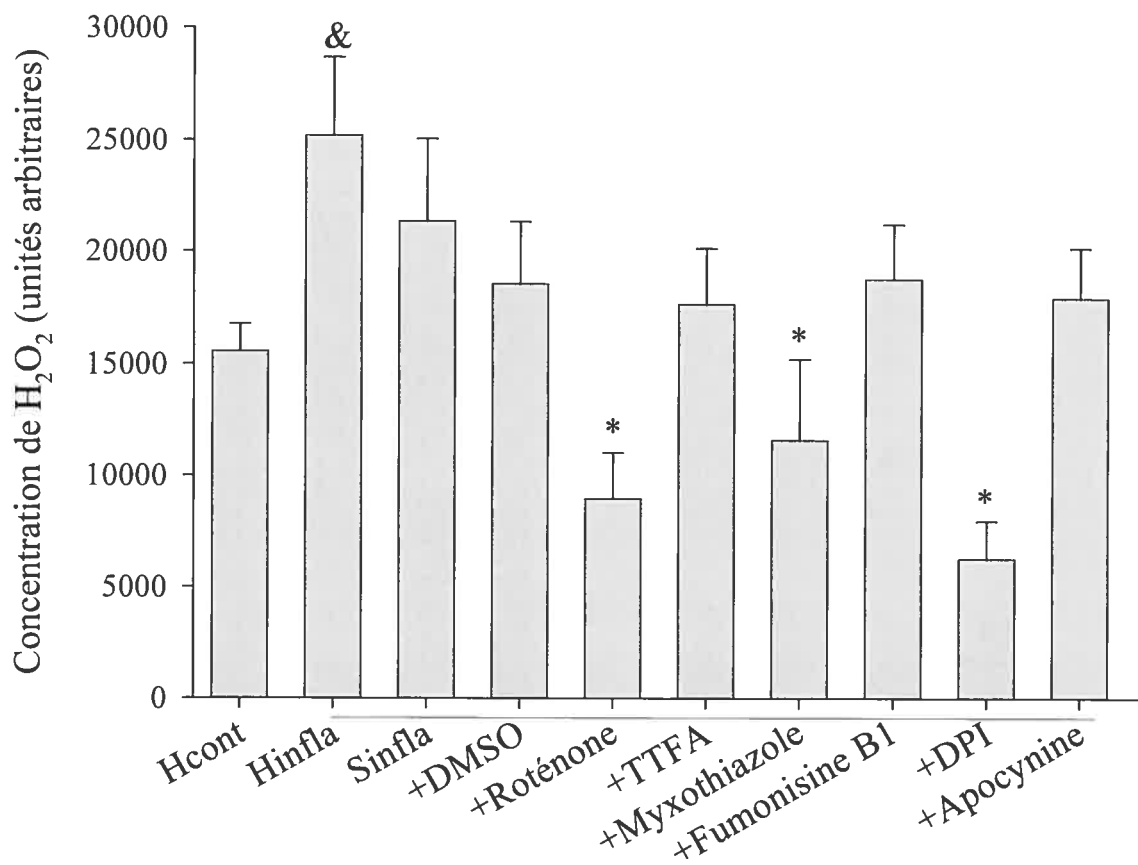


Figure 19. Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>) et de lapins avec une réaction inflammatoire (H<sub>infla</sub>), incubés avec du sérum (S<sub>infla</sub>) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\* p < 0,05 comparé à S<sub>infla</sub>, & p < 0,05 comparé à H<sub>cont</sub>, n = 5

#### **4.2 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur la diminution d'activité du CYP1A2 produite par le sérum de lapin avec une réaction inflammatoire**

L'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 a été mesurée en présence de sérum et de roténone, de TTFA, de myxothiazole, de fumonisine B1, de DPI et d'apocynine afin de documenter si l'inhibition des sources de dérivés radicalaires de l'oxygène pouvait modifier la baisse d'activité produite par le sérum d'un lapin avec une réaction inflammatoire.

Dans les hépatocytes provenant de lapins témoins (Figure 20), le sérum de lapin avec une réaction inflammatoire n'affecte pas l'activité du CYP1A2. La présence de myxothiazole et de DPI diminue l'activité du CYP1A2, tandis que la présence de fumonisine B1 l'augmente. Le DMSO, la roténone, le TTFA et l'apocynine n'affectent pas l'activité du CYP1A2 dans les hépatocytes incubés avec du sérum.

Dans les hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire, (Figure 21), aucun des inhibiteurs ne parvient à prévenir la baisse d'activité du CYP1A2 produite par le sérum. Au contraire, le DPI accentue cette baisse. Le myxothiazole a tendance à accentuer la baisse d'activité. Toutefois cette baisse n'est pas significative.

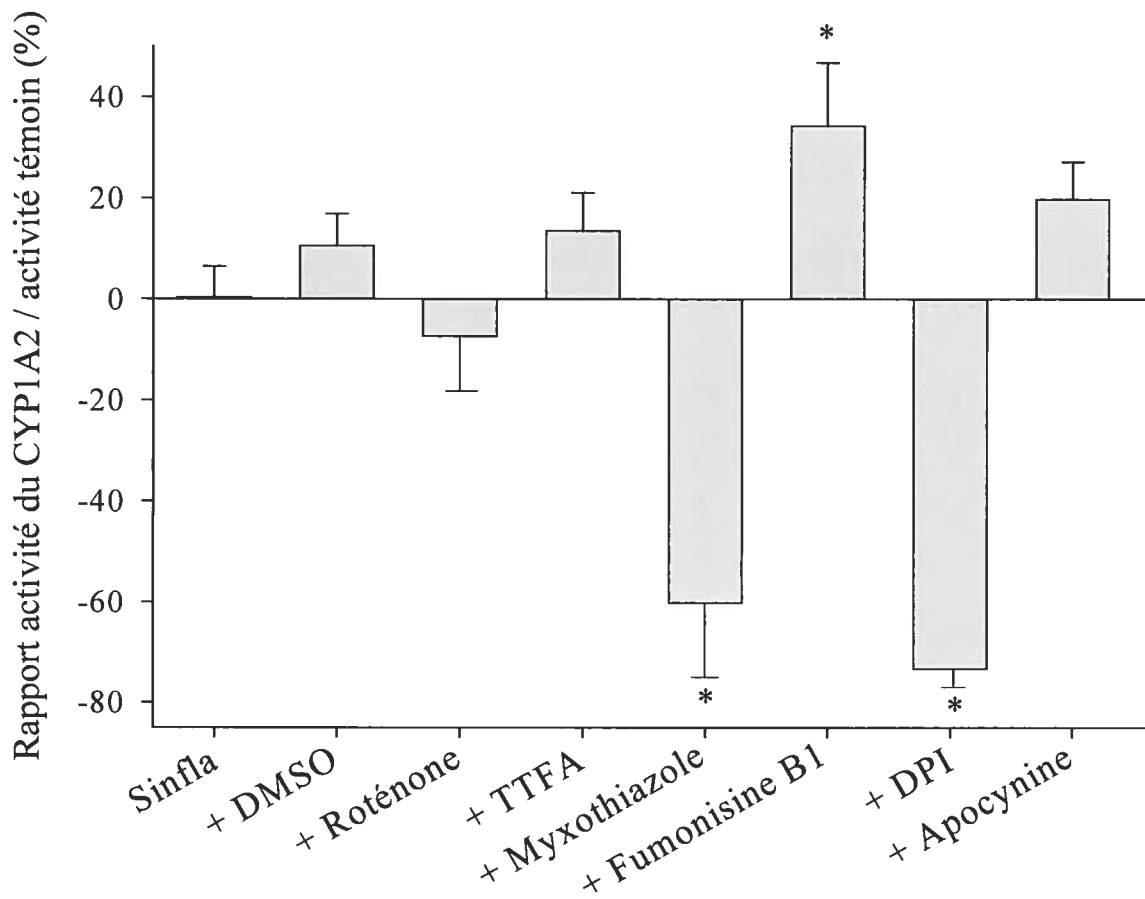


Figure 20. Changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes procédant de lapins témoins, incubés avec du sérum de lapin avec une réaction inflammatoire ( $S_{infla}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\*  $p < 0,05$  comparé à  $S_{infla}$ ,  $n = 6$ .

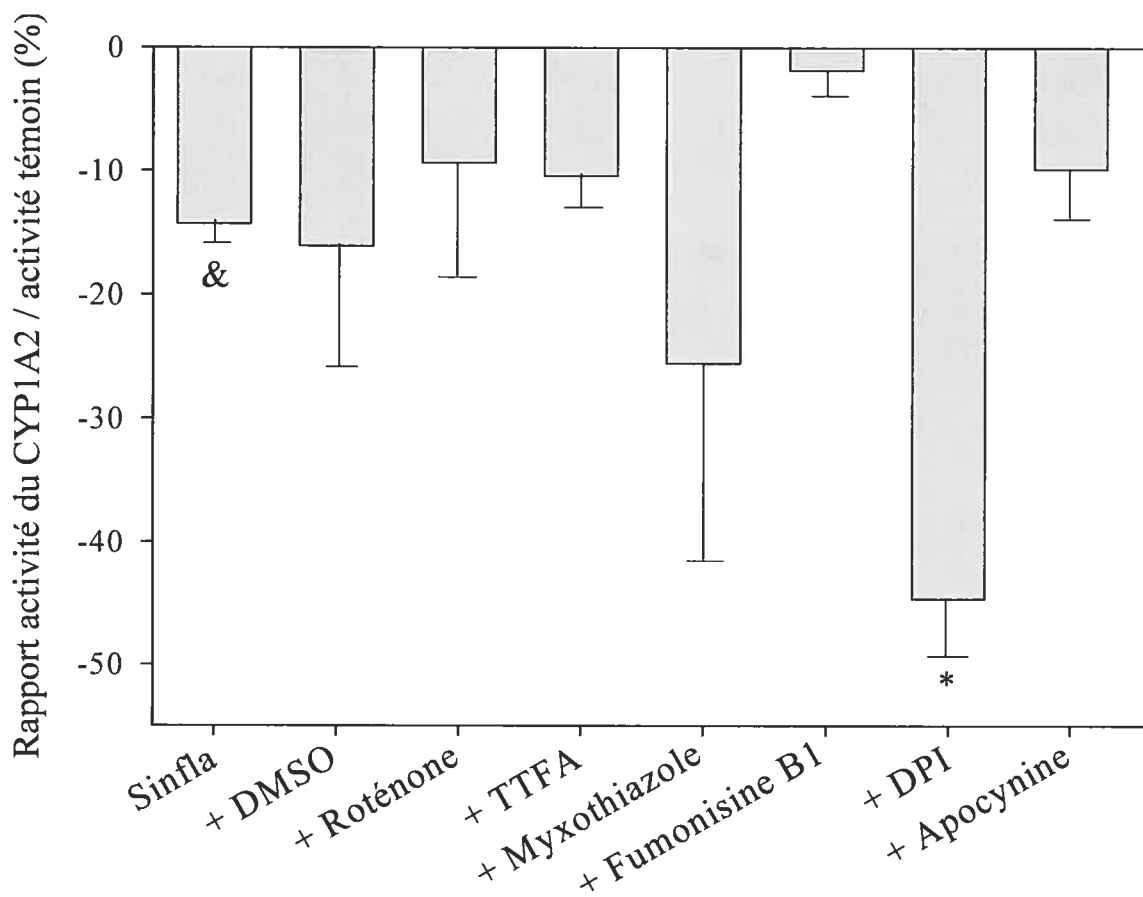


Figure 21. Changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire, incubés avec du sérum de lapin avec une réaction inflammatoire ( $S_{infla}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\*  $p < 0,05$  comparé à  $S_{infla}$ , &  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 10$ .

### **4.3 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur la diminution d'activité du CYP3A6 produite par le sérum de lapin avec une réaction inflammatoire**

Dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (Figure 22) où le sérum de lapin avec une réaction inflammatoire ne produit pas de changement dans l'activité du CYP3A6, le DMSO, le TTFA, la fumonisine B1 et l'apocynine n'affectent pas l'activité de l'enzyme. Par contre, la roténone et le myxothiazole ont tendance à diminuer l'activité du CYP3A6 et le DPI produit une diminution d'activité significative.

Dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (Figure 23), le DMSO, le TTFA, la fumonisine B1 et l'apocynine ne modifient pas la diminution d'activité du CYP3A6 produite par le sérum. Par ailleurs, la roténone, le myxothiazole et le DPI accentuent la diminution d'activité du CYP3A6 produite par le sérum d'un lapin avec une réaction inflammatoire.



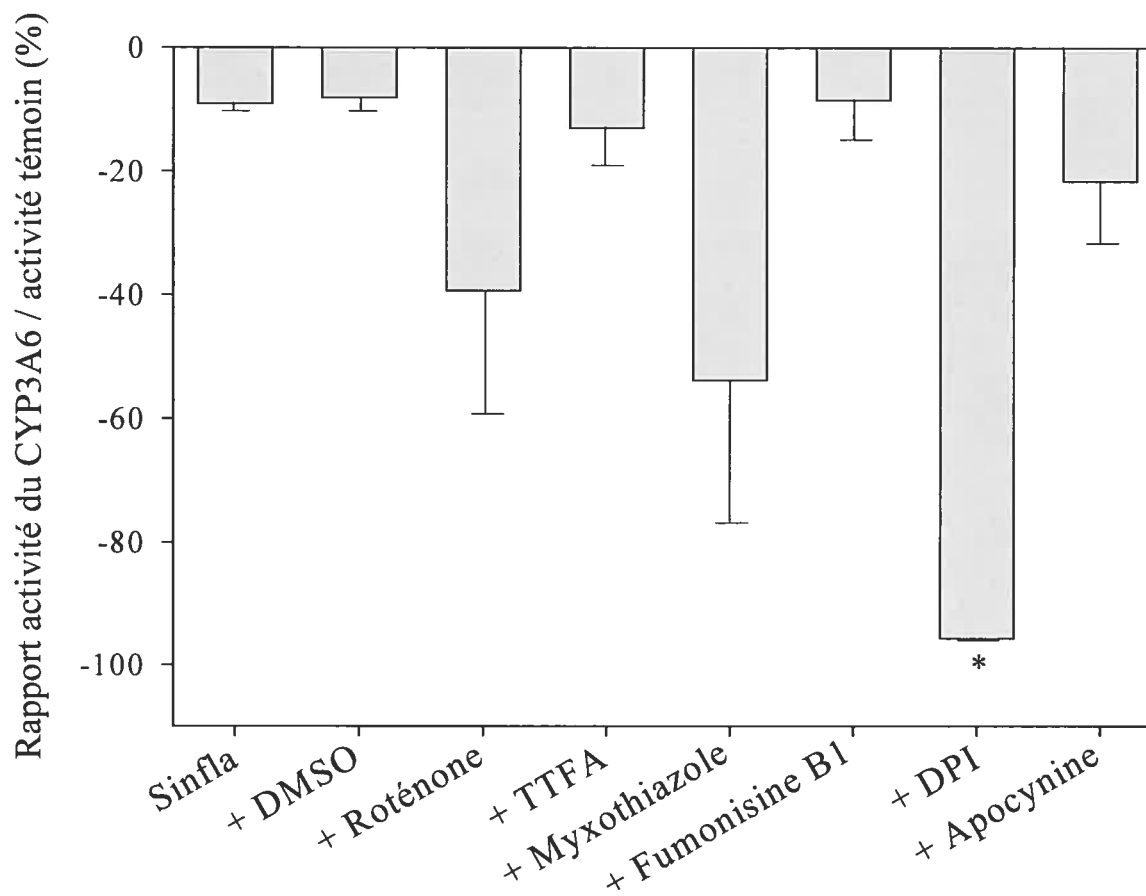


Figure 22. Changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes provenant de lapins témoins, incubés avec du sérum de lapin avec une réaction inflammatoire ( $S_{infla}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\*  $p < 0,05$  comparé à  $S_{infla}$ ,  $n = 4$ .

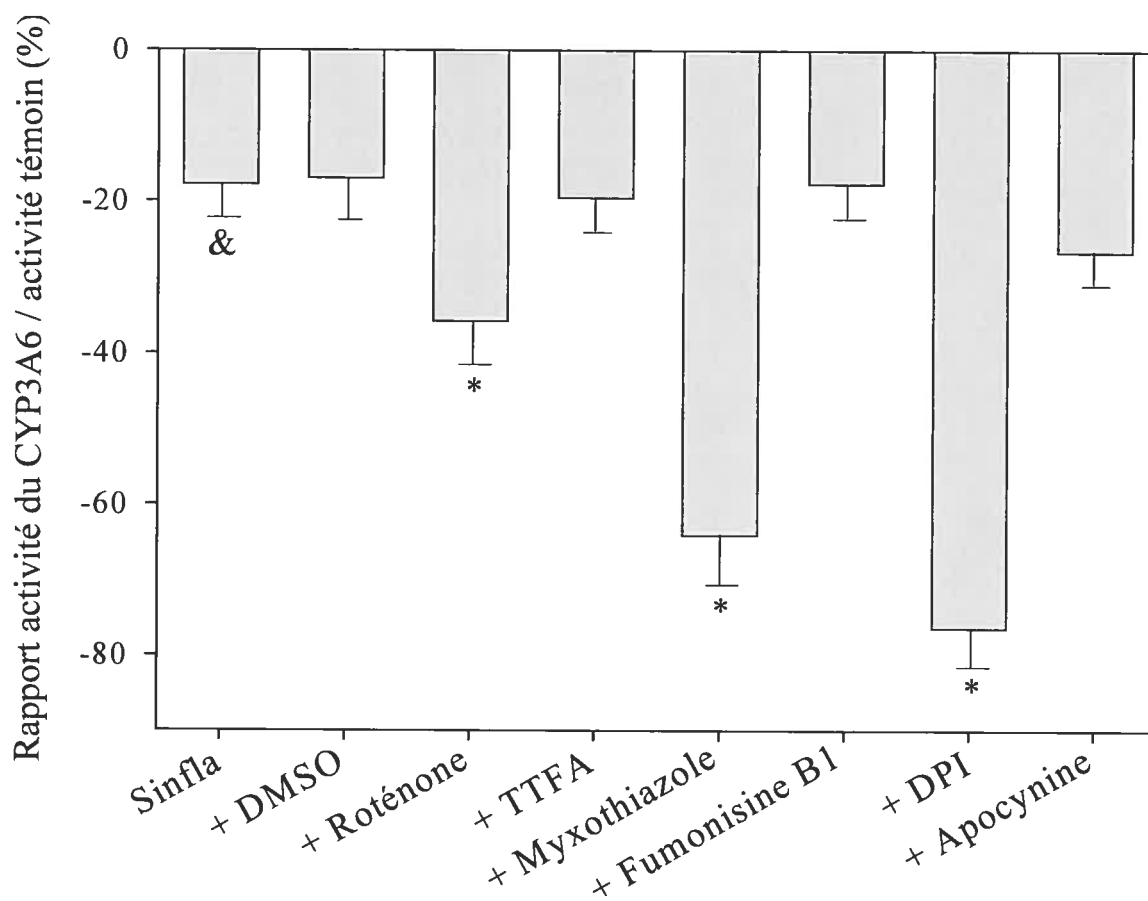


Figure 23. Changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire, incubés avec du sérum de lapin avec une réaction inflammatoire ( $S_{infla}$ ) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine. \*  $p < 0,05$  comparé à  $S_{infla}$ , &  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 12$ .

### 5- Effet de l'interleukine-6 sur l'activité des CYP1A2 et CYP3A6

L'interleukine-6 (IL-6) est dans le sérum le médiateur responsable de la baisse d'activité des CYP1A2 et CYP3A6 pendant la réaction inflammatoire produite par la térébenthine. Nous avons donc examiné si cette baisse d'activité produite par l'IL-6 était associée à la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Dans les hépatocytes provenant de lapins témoins, la présence d'IL-6 diminue l'activité du CYP3A6 mais pas celle du CYP1A2. Par contre, dans les hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire, l'IL-6 produit une diminution de l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 (Tableau 6).

<b>CYP1A2</b>		
	Témoin	Témoin + IL-6
<b>H<sub>cont</sub></b>	12388 ± 1916 (n=4)	10674 ± 3510 (n=4)
<b>H<sub>infla</sub></b>	7634 ± 1172 (n=3)	6794 ± 1024* (n=3)
<b>CYP3A6</b>		
	Témoin	Témoin + IL-6
<b>H<sub>cont</sub></b>	8645 ± 714 (n=13)	7576 ± 708* (n=13)
<b>H<sub>infla</sub></b>	2695 ± 350 (n=9)	2275 ± 334* (n=9)

Tableau.6 Activités du CYP1A2 et du CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>) ou de lapins avec une réaction inflammatoire (H<sub>infla</sub>), en présence ou en absence d'IL-6 (témoin ou témoin + IL6).

\* p<0,05 comparé au témoin.

### 5.1 Effet de l'interleukine-6 sur les concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Les résultats démontrent que l'IL-6 n'affecte pas la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ni dans les hépatocytes provenant de lapins témoins (Figure 24), ni dans ceux provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (Figure 25).

Dans les hépatocytes provenant de lapins témoins (Figure 24), en présence d'IL-6, la roténone, le myxothiazole et le DPI produisent une diminution significative de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dans des proportions qui semblent les mêmes qu'en absence d'IL-6.

Dans les hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (Figure 25) le DPI produit également une diminution de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dans une proportion qui semble la même qu'en absence d'IL-6. La roténone et le myxothiazole ont tendance à diminuer la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence d'IL-6; toutefois ces diminutions ne sont pas significatives.

Le DMSO, le TTFA, la fumonisine B1 et l'apocynine n'affectent pas la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les hépatocytes provenant de lapins témoins et dans ceux provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (Figure 24 et Figure 25).

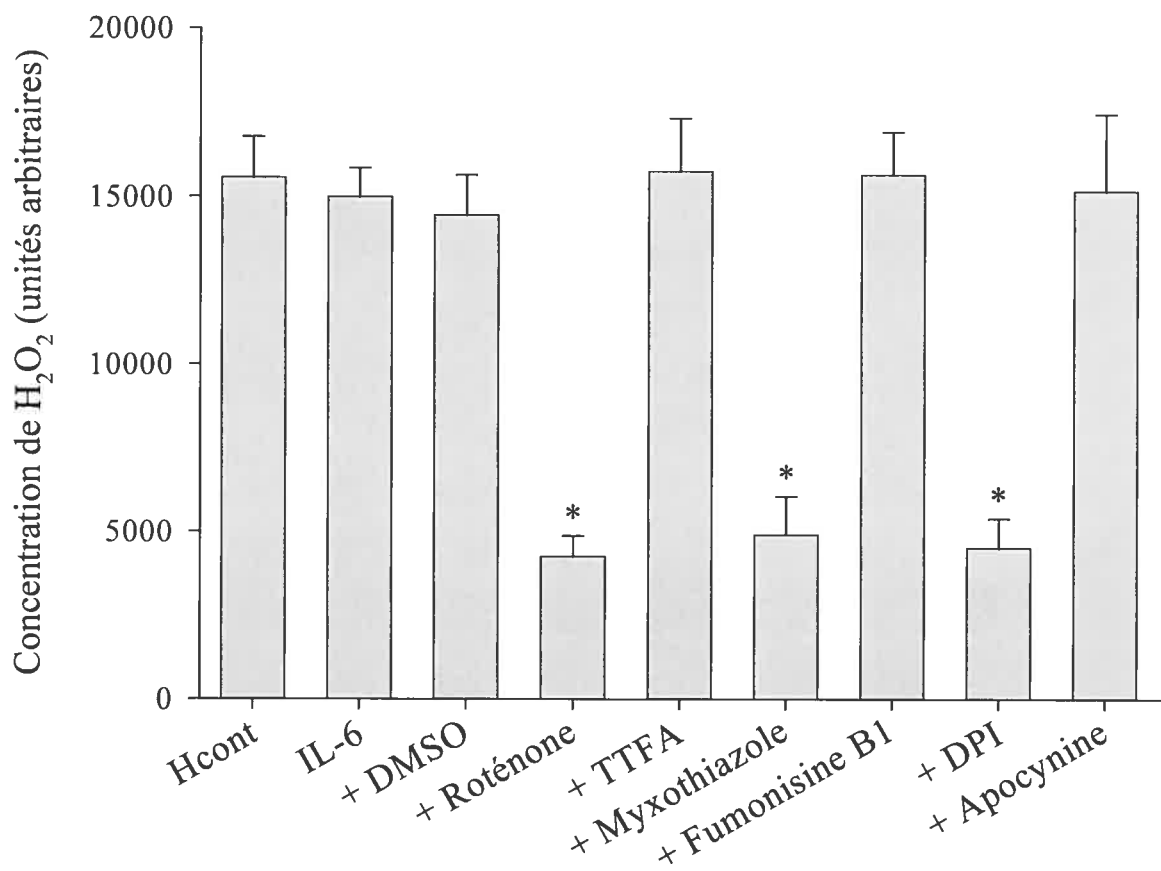


Figure 24. Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>), incubés avec de l'interleukine-6 (IL-6) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\* p<0,05 comparé à IL-6, n = 5.

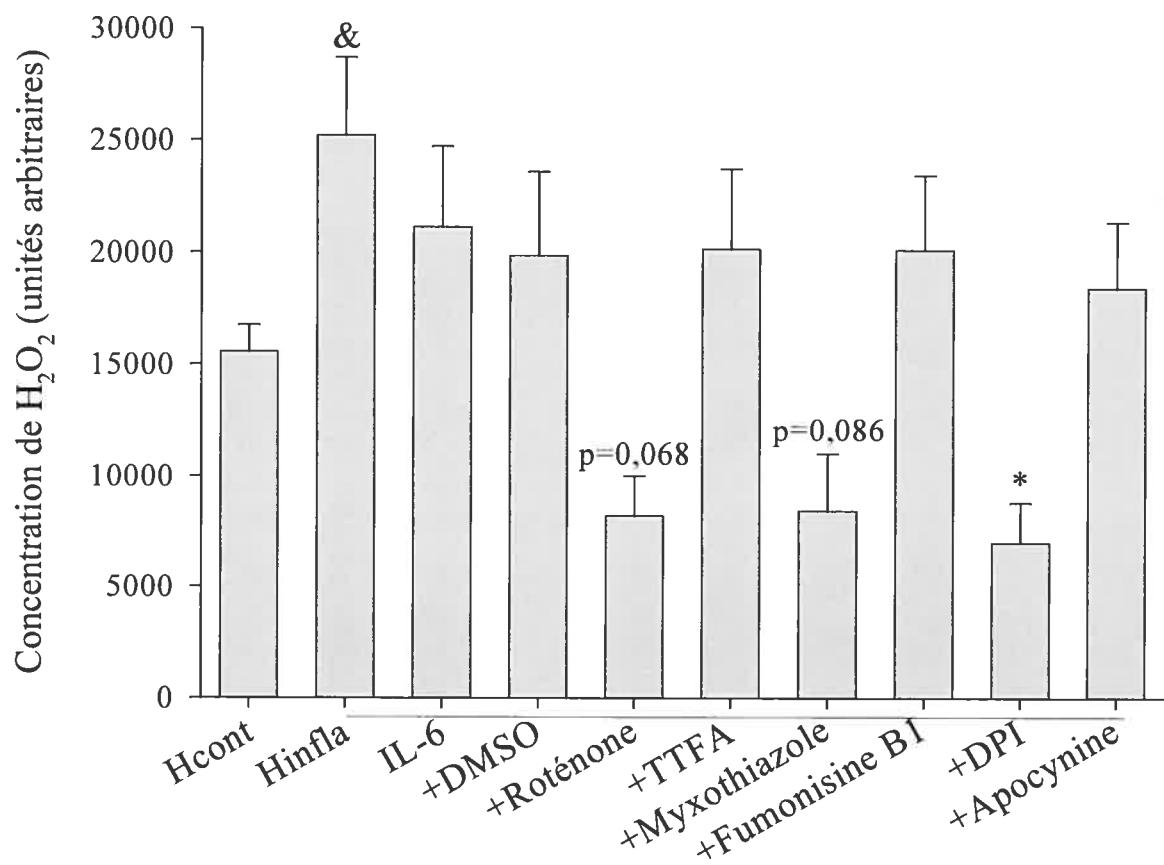


Figure 25. Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>) et de lapins avec une réaction inflammatoire (H<sub>infla</sub>), incubés avec de l'interleukine-6 (IL-6) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, de DPI ou de l'apocynine.

\* p<0,05 comparé à IL-6, & p<0,05 comparé à H<sub>cont</sub> n = 5.

## **5.2 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'activité du CYP1A2 dans des hépatocytes incubés avec de l'interleukine-6**

Dans des hépatocytes provenant de lapins témoins incubés avec de l'IL-6, l'addition de DMSO, de roténone, de TTFA, de myxothiazole, de fumonisine B1, de DPI et d'apocynine n'a pas modifié significativement l'activité du CYP1A2 (Figure 26).

Dans les hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (Figure 27), le DMSO, la roténone, le myxothiazole, le TTFA, la fumonisine B1 et l'apocynine ne modifient pas la baisse d'activité du CYP1A2 produite par l'IL-6. Le DPI accentue cette baisse d'activité.

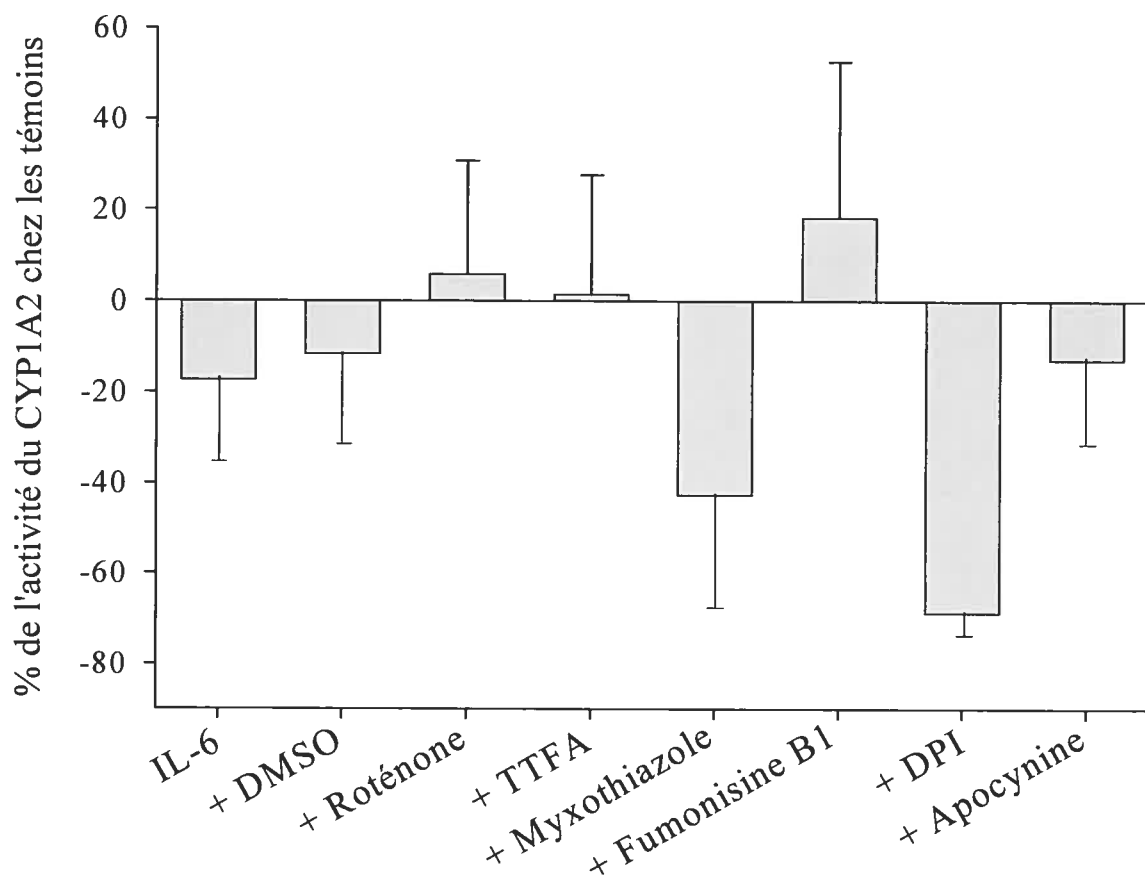


Figure 26. Changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes provenant de lapins témoins, incubés avec de l'interleukine-6 (IL-6) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

n = 4



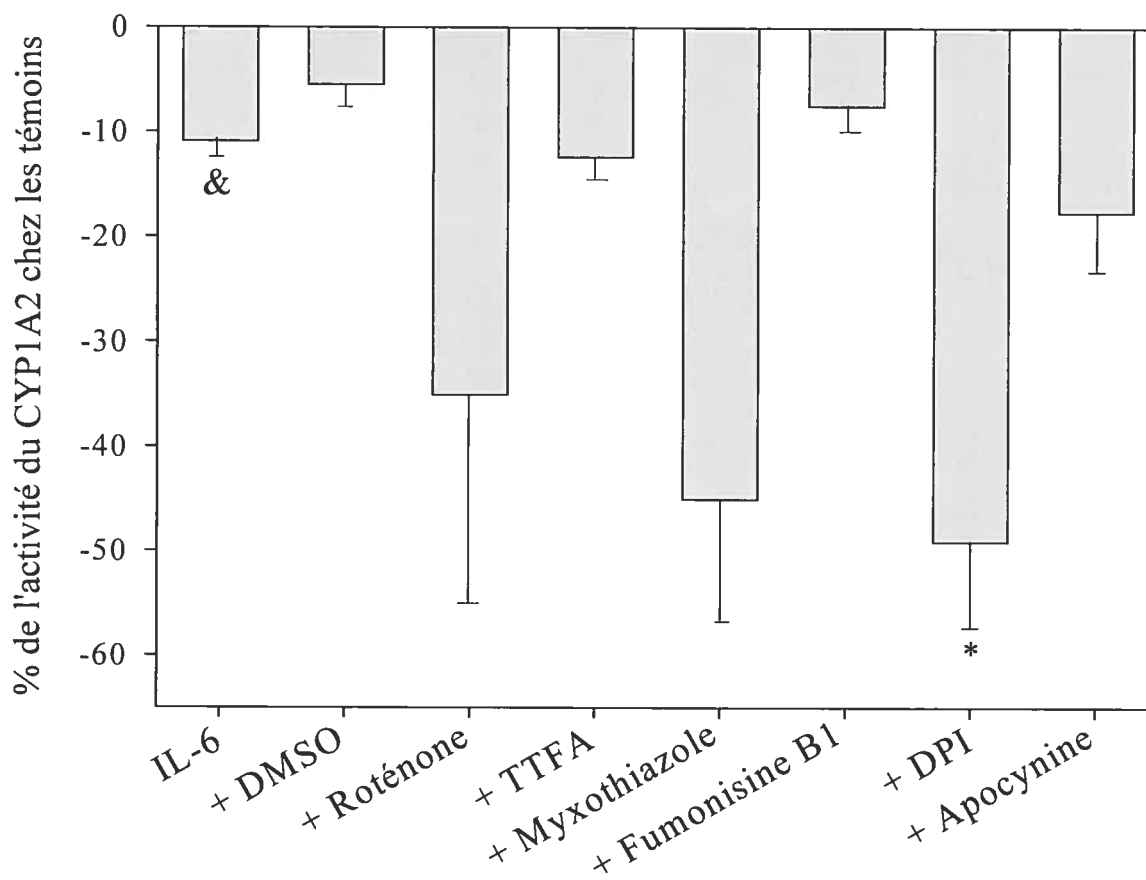


Figure 27. Changements dans l'activité du CYP1A2 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire, incubés avec de l'interleukine-6 (IL-6) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\*  $p < 0,05$  comparé à IL-6, &  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 3$ .

### **5.3 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'activité du CYP3A6 dans des hépatocytes incubés avec de l'interleukine-6**

L'activité du CYP3A6 est diminuée par la présence d'IL-6 dans des hépatocytes témoins et dans des hépatocytes provenant d'un lapin avec une réaction inflammatoire (Tableau 6). Le DMSO, le TTFA, la fumonisine B1 et l'apocynine ne modifient pas cette baisse d'activité produite par l'IL-6.

Dans les hépatocytes provenant de lapins témoins, le myxothiazole et le DPI accentuent la diminution d'activité du CYP3A6 (Figure 28). De plus, dans les hépatocytes provenant d'un lapin avec une réaction inflammatoire, ce sont la roténone, le myxothiazole et le DPI qui accentuent la diminution d'activité produite par l'IL-6 (Figure 29).

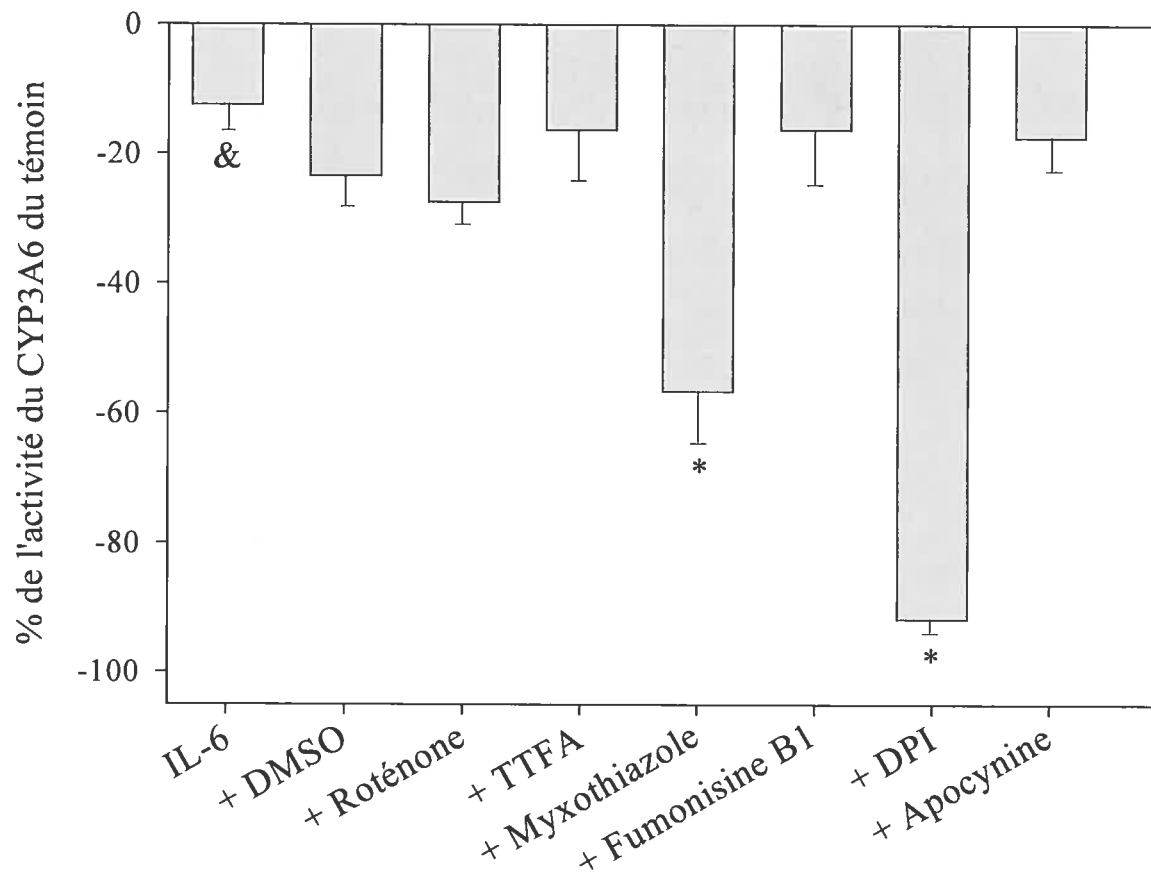


Figure 28. Changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin), dans des hépatocytes provenant de lapins témoins, incubés avec de l'interleukine-6 (IL-6) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\*  $p < 0,05$  comparé à IL-6, &  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 13$ .

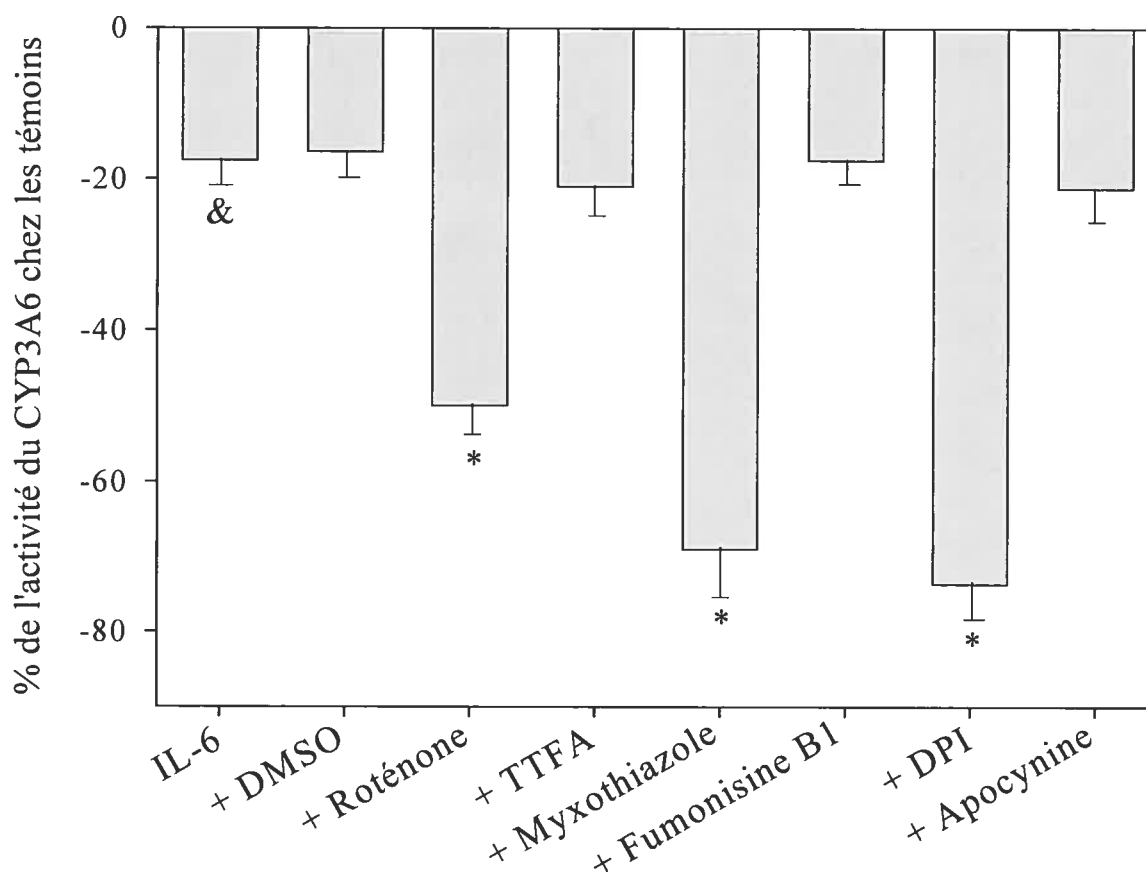


Figure 29. Changements dans l'activité du CYP3A6 (exprimés en pourcentage du témoin) dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire, en présence d'interleukine-6 (IL-6) et de DMSO, de roténone, de TTFA, de myxothiazole, de fumonisine B1, de DPI et d'apocynine.

\*  $p < 0,05$  comparé à IL-6, &  $p < 0,05$  comparé au témoin,  $n = 8$ .

## 6- Étude du rôle du NO<sup>•</sup> dans la diminution d'activité des CYP1A2 et CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire

Des études précédentes ont suggéré que le NO<sup>•</sup> est impliqué dans la diminution d'activité des CYP1A2 et CYP3A6 produite par le sérum et l'interleukine-6 lors de la réaction inflammatoire (El-Kadi et coll., 2000; Levitchi et coll., 2004, Kourylko et coll., 2006).

En premier lieu, nous avons comparé les concentrations de NO<sup>•</sup> dans des hépatocytes de lapins témoins et dans des hépatocytes de lapins ayant une réaction inflammatoire.

Contrairement aux données publiées dans la littérature (Levitchi et coll., 2004; Kourylko et coll., 2006), la concentration de NO<sup>•</sup> dans les hépatocytes de lapins avec une réaction inflammatoire ne diffère pas de la concentration de NO<sup>•</sup> dans les hépatocytes de lapins témoins (Tableau 7).

	H <sub>cont</sub>	H <sub>infla</sub>
Concentration de NO <sup>•</sup> (μM)	2,324 ± 0,367 (n = 4)	2,601 ± 0,345 (n = 3)

Tableau 7. Concentration de NO<sup>•</sup> dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>) et de lapins avec une réaction inflammatoire (H<sub>infla</sub>).

### **6.1 Effet de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur la concentration de NO<sup>•</sup>**

Par comparaison aux valeurs de base de concentration de NO<sup>•</sup>, le DMSO, la roténone, le TTFA, le myxothiazole, la fumonisine B1, le DPI et l'apocynine ne changent pas de manière significative la concentration de NO<sup>•</sup> dans les hépatocytes provenant de lapins témoins et dans les hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (Figures 30 et 31).

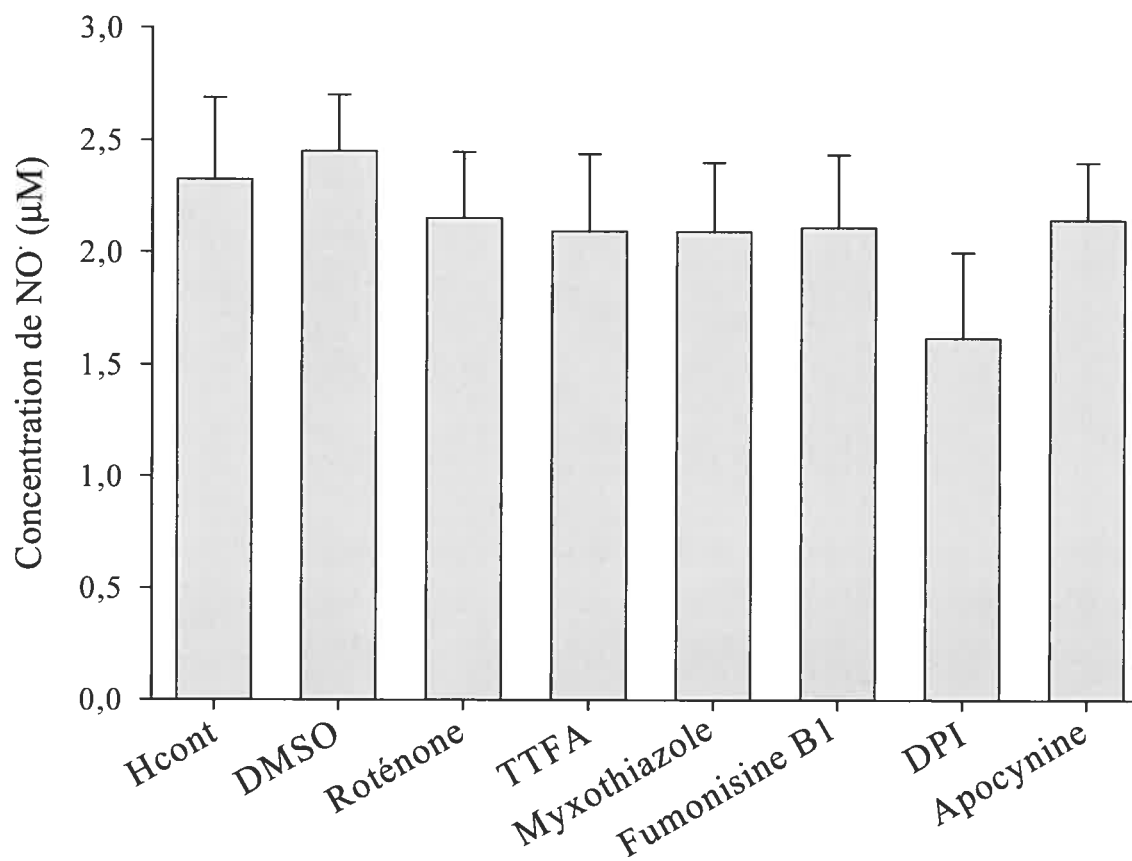


Figure 30. Concentration de NO· dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>) et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

n = 4

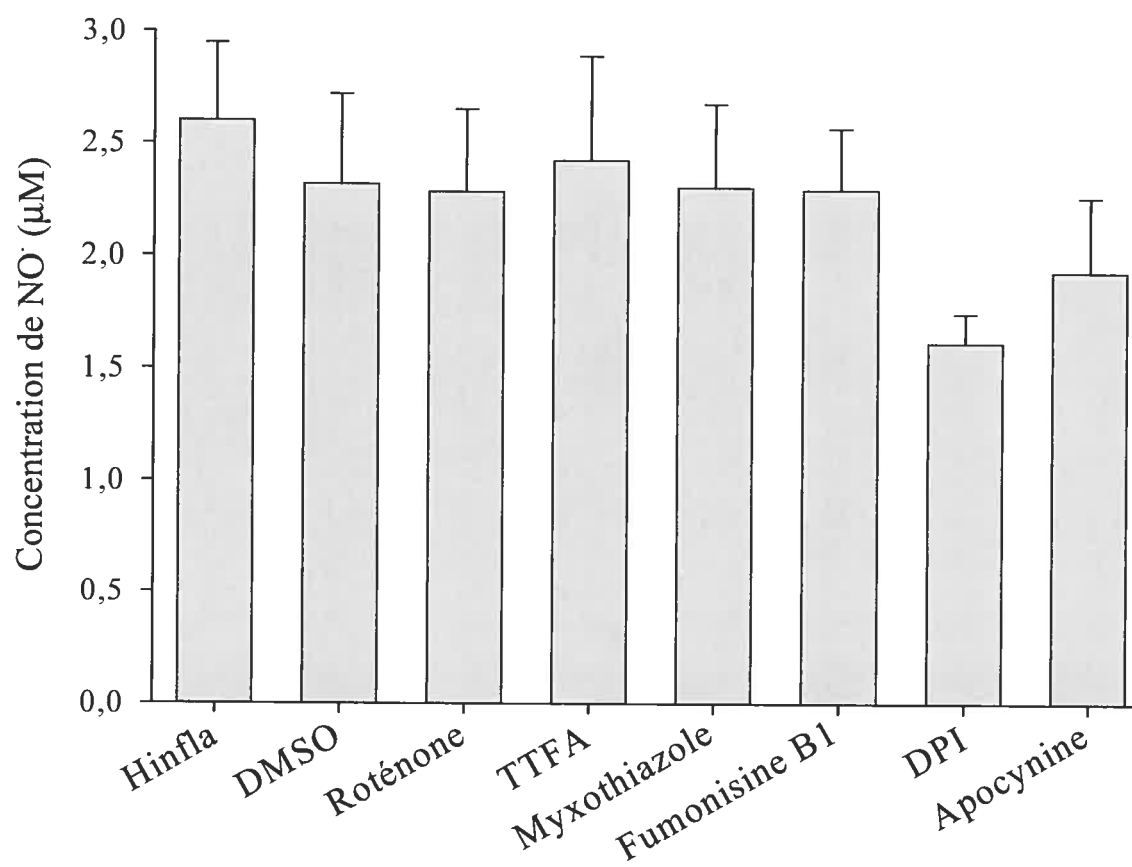


Figure 31. Concentration de NO<sup>•</sup> dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (H<sub>infla</sub>) et incubés avec du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine.  
n = 3



## 6.2 Effet du sérum sur la concentration de NO<sup>•</sup>

Dans des hépatocytes provenant de lapins témoins incubés pendant quatre heures avec du sérum provenant d'un lapin ayant une réaction inflammatoire, la concentration de NO<sup>•</sup> est légèrement augmentée comparé au témoin mais le changement n'est pas significatif (Figure 32). Par contre, dans les hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire le sérum de lapin avec une réaction inflammatoire produit une augmentation significative de la concentration de NO<sup>•</sup> (Figure 33). Le DMSO, la roténone, le TTFA, le myxothiazole, la fumonisine B1, le DPI et l'apocynine ne parviennent pas à modifier les changements de concentration de NO<sup>•</sup> produits par le sérum de lapin avec une réaction inflammatoire (Figure 33).

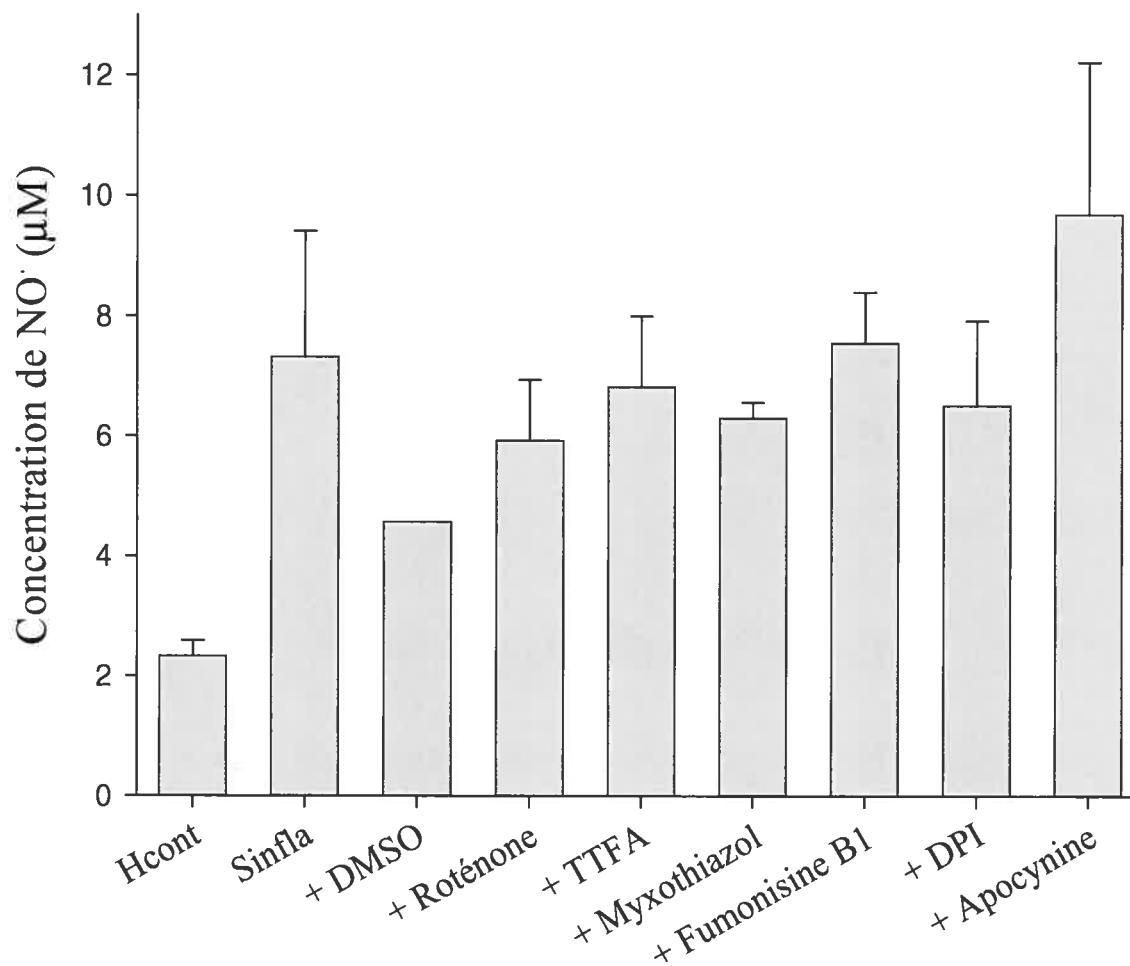


Figure 32. Concentration de NO· dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>), incubés avec du sérum (S<sub>infla</sub>) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.  
n = 3

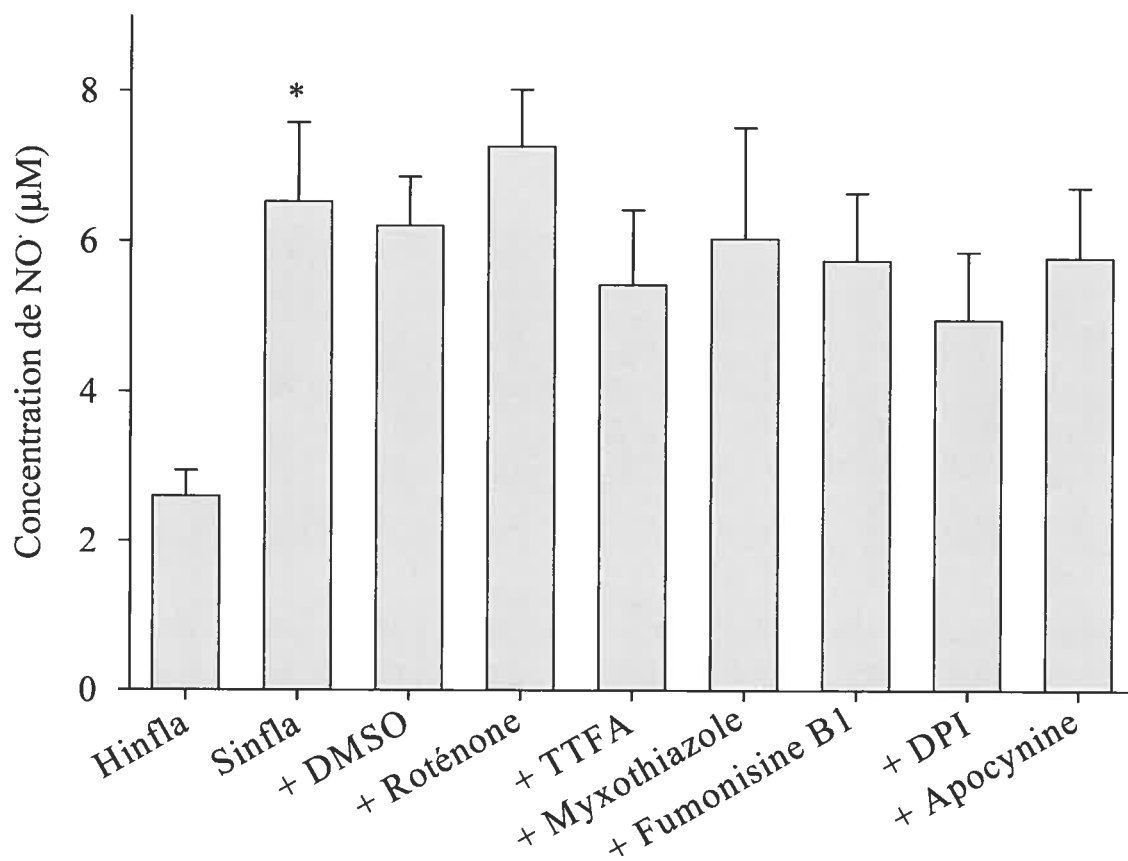


Figure 33. Concentration de NO· dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (H<sub>infla</sub>), incubés avec du sérum (S<sub>infla</sub>) et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.

\*,  $p < 0,05$  comparé à H<sub>infla</sub>, n = 3

### 6.3 Effet de l'interleukine-6 sur la concentration de NO<sup>•</sup>

Nous avons vérifié si l'IL-6, le principal médiateur sérique de la baisse d'activité du cytochrome P450 lors d'une réaction inflammatoire septique induite par l'injection de térébenthine, augmentait la concentration de NO<sup>•</sup> et si ce changement pouvait être prévenu par le DMSO, la roténone, le TTFA, le myxothiazole, la fumonisine B1, le DPI et l'apocynine.

Contrairement aux observations rapportées dans la littérature (Levitchi et coll., 2004; Kourylko et coll., 2006), l'IL-6 ne modifie pas de manière significative la concentration de NO<sup>•</sup>, ni dans les hépatocytes de lapins témoins, ni dans les hépatocytes de lapins avec une réaction inflammatoire. En présence d'IL-6, le DMSO, la roténone, le TTFA, le myxothiazole, la fumonisine B1, le DPI et l'apocynine n'affectent pas la concentration de NO<sup>•</sup> (Figures 34 et 35).

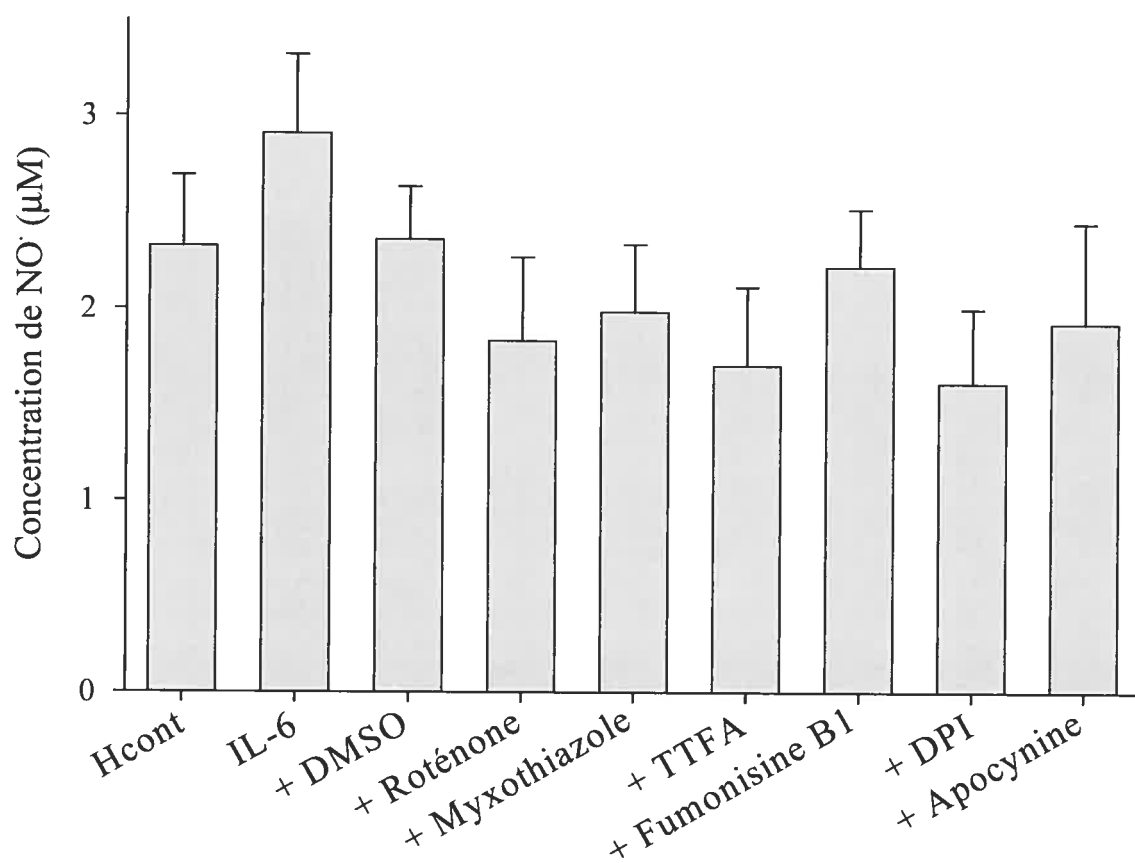


Figure 34. Concentration de NO<sup>•</sup> dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (H<sub>cont</sub>), incubés avec de l'IL-6 et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.  
n = 3

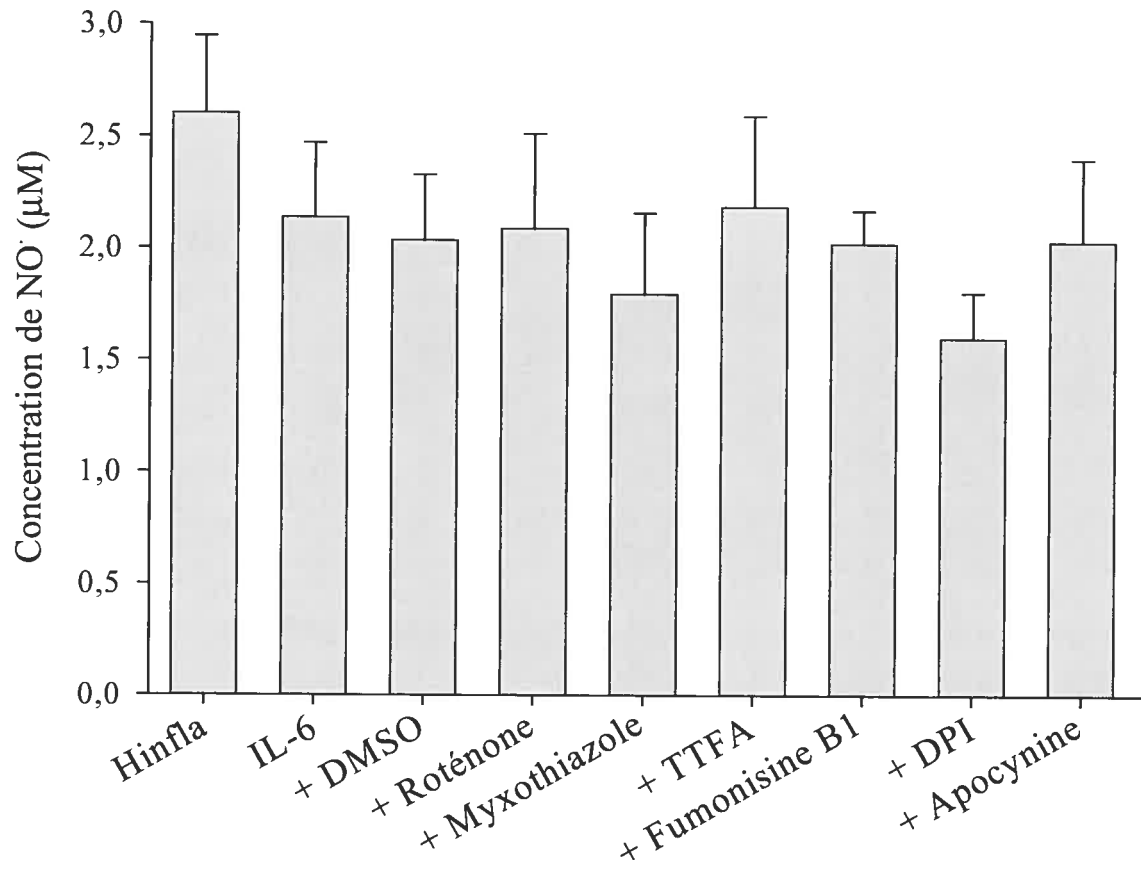


Figure 35. Concentration de NO<sup>•</sup> dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire, incubés avec de l'IL-6 et du DMSO, de la roténone, du TTFA, du myxothiazole, de la fumonisine B1, du DPI ou de l'apocynine.  
n = 3

**A**

Paramètre	Activité du CYP1A2			Activité du CYP3A6		
	Hép. seul	+ sérum	+ IL-6	Hép. seul	+ sérum	+ IL-6
Roténone	--	--	--	↓	--	--
Myxothiazole	↓	↓	--	↓	--	↓
TTFA	--	--	--	--	--	--
Fumonisine	↑	↑	--	--	--	--
DPI	↓	↓	--	↓	↓	↓
Apocynine	--	--	--	--	--	--

**B**

Paramètre	Concentration de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			Concentration de NO		
	Hép. seul	+ sérum	+ IL-6	Hép. seul	+ sérum	+ IL-6
Roténone	↓	↓	↓	--	--	--
Myxothiazole	↓	↓	↓	--	--	--
TTFA	--	--	--	--	--	--
Fumonisine	--	--	--	--	--	--
DPI	↓	↓	↓	--	--	--
Apocynine	--	--	--	--	--	--

**C**

Paramètre	Activité du CYP1A2			Activité du CYP3A6		
	Hép. seul	+ sérum	+ IL-6	Hép. seul	+ sérum	+ IL-6
Roténone	--	--	--	↓	↓	↓
Myxothiazole	↓	--	--	↓	↓	↓
TTFA	--	--	--	--	--	--
Fumonisine	--	--	--	--	--	--
DPI	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Apocynine	--	--	--	--	--	--

**D**

Paramètre	Concentration de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			Concentration de NO		
	Hép. seul	+ sérum	+ IL-6	Hép. seul	+ sérum	+ IL-6
Roténone	↓	↓	--	--	--	--
Myxothiazole	--	↓	--	--	--	--
TTFA	--	--	--	--	--	--
Fumonisine	--	--	--	--	--	--
DPI	↓	↓	↓	--	--	--
Apocynine	--	--	--	--	--	--

Hep : hépatocytes

Tableau 8. Tableau récapitulatif des effets des inhibiteurs dans des hépatocytes provenant de lapin témoins (A et B) et provenant de lapins avec une réaction inflammatoire (C et D).  
Hép. seul : hépatocyte seul

#### **IV- DISCUSSION**

L'intérêt porté aux dérivés radicalaires de l'oxygène a crû énormément ces dernières années étant donné la variété de pathologies dans lesquelles ils ont été impliqués et la découverte de l'importance de leur rôle endogène.

Les dérivés radicalaires de l'oxygène jouent un rôle important dans le processus inflammatoire. Aux sites d'inflammation, les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages sont capables de générer des dérivés radicalaires de l'oxygène via l'enzyme NADPH oxydase (Nagata, 2005).

En plus de la NADPH oxydase, lors de la réaction inflammatoire, d'autres sources comme les mitochondries et la xanthine oxydase peuvent contribuer à la génération de dérivés radicalaires de l'oxygène.

Les conséquences de ce stress oxydatif sur les protéines cellulaires font encore l'objet de recherches. Il a été suggéré que le stress oxydatif contribue à la synthèse de cytokines via l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, ainsi qu'à la phosphorylation de kinases comme la protéine ERK et le p38 (Closa et Folch-Puy, 2004).

De même, bien qu'il ait été démontré *in vitro* et dans des modèles animaux que les radicaux libres jouaient un rôle dans la signalisation cellulaire, peu d'études ont réussi à démontrer de manière directe et concluante les répercussions cliniques de ce rôle.

Une des conséquences de la réaction inflammatoire est l'inactivation et la diminution de l'expression des isoformes du cytochrome P450. A cause du rôle des dérivés radicalaires de l'oxygène et du NO<sup>•</sup> dans la signalisation et lors de la réaction



inflammatoire, il a été suggéré que ces radicaux libres pouvaient être impliqués dans l'inactivation des enzymes du cytochrome P450.

### **1- Le peroxyde d'hydrogène dans la réaction inflammatoire**

L'étude de El-kadi et coll. (2000) documentait le rôle des dérivés radicalaires de l'oxygène dans la baisse d'activité du cytochrome P450 causée par le sérum d'un lapin avec une réaction inflammatoire. Cette étude a démontré que des quantités croissantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de NO<sup>•</sup> diminuaient la quantité de cytochrome P450 total actif. Parallèlement, elle montrait que la présence d'antioxydants prévenait partiellement l'inactivation des isoformes du cytochrome P450 causée par le sérum. Par contre, des inhibiteurs des antioxydants superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase augmentaient l'effet inhibiteur du sérum sur l'activité et la quantité du cytochrome P450.

Dans notre étude, en utilisant le même modèle de réaction inflammatoire, nous avons voulu démontrer directement quelle(s) étai(en)t les sources des dérivés radicalaires de l'oxygène impliqués dans l'inactivation du cytochrome P450. Nous avons également étudié l'effet des dérivés radicalaires de l'oxygène sur l'activité de deux isoformes spécifiques du cytochrome P450, soit le CYP1A2 et le CYP3A6. Nous avons choisi ces deux enzymes car leur expression est régulée très différemment : l'expression du CYP1A2 est régulée par le récepteur Ah, tandis que celle du CYP3A6 est régulée par le récepteur PXR (Nebert, 2000; Waxman, 1999). Ces divergences nous donnent une plus grande information sur le cytochrome P450 en général. De plus, ces deux enzymes sont d'une importance particulière car le CYP3A6 du lapin est l'équivalent du CYP3A4 humain. Le CYP3A4 est une des enzymes les plus abondantes du cytochrome P450

hépatique et est impliquée dans la biotransformation d'environ 40% des médicaments sur le marché dont plusieurs anti-inflammatoires (Guengerich, 2003; Schwab et Klotz, 2001). Il est donc important de savoir comment l'activité de cette enzyme est régulée en présence d'une réaction inflammatoire. Quant au CYP1A2, elle est responsable du métabolisme de la caféine, d'antipsychotiques et de la théophylline et a été impliquée dans l'augmentation de la demi-vie de ce médicament lors d'infections virales (Chang et coll., 1978).

Nous avons montré que la production de  $H_2O_2$  était augmentée lors de la réaction inflammatoire ce qui en fait une bonne molécule candidate pour l'inactivation du cytochrome P450. Nous avons également pu établir que le  $H_2O_2$  diminuait l'activité des isoformes CYP1A2 et CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapins témoins. Le  $H_2O_2$  diminue l'activité du CYP1A2 à des concentrations supérieures à 1 mM. La courbe standard de fluorescence que nous avons établie dans les hépatocytes provenant de lapins témoins, indique que cette concentration correspond à une fluorescence du DCF de 27168 unités arbitraires. De même, le  $H_2O_2$  diminue l'activité du CYP3A6 à des concentrations supérieures à 0.25 mM. A cette concentration, la fluorescence du DCF observée dans les hépatocytes est de 25537 unités arbitraires.

Dans les hépatocytes provenant de lapins témoins, la fluorescence de base du DCF est de  $15570 \pm 1195$  unités arbitraires. Dans les hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire, cette fluorescence est augmentée jusqu'à  $25217 \pm 3473$  unités arbitraires ce qui correspond à des concentrations inférieures à 0.25 mM. Ces résultats montrent que lors de la réaction inflammatoire, l'augmentation de  $H_2O_2$  n'atteint pas des niveaux permettant une inactivation des enzymes du cytochrome P450.

Toutefois, ces résultats obtenus *in vitro* ne reflètent pas nécessairement les concentrations retrouvées *in vivo* étant donné le système complexe de production et de neutralisation des dérivés radicalaires de l'oxygène. Il existe peu d'informations sur les concentrations physiologiques de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans les poumons, la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été évaluée en mesurant la quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> expirée dans l'haleine qui est de l'ordre de 4 pmol/heure chez des témoins (Wilhelm et coll., 2003). D'autres études ont évalué les concentrations dans l'haleine comme variant de 0,01 nM à 0,45 µM chez des personnes saines (Montuschi, 2005). Dans des hépatocytes isolés de souris, la concentration à l'équilibre de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été évaluée à 0,1 ± 0,02 µM (Oursler et coll., 2004). Selon l'agence européenne pour l'évaluation des produits médicaux, la concentration à l'équilibre dans le foie humain a été évaluée à 30 ng/kg, soit 1,02 µmol/kg. De plus, les données concernant les concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lors d'une réaction inflammatoire sont également incertaines. Dans un modèle *in vitro* d'inflammation de l'œsophage chez le chat, il a été démontré que l'IL-6 induit une augmentation de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le muscle lisse de l'œsophage. Cette concentration est de l'ordre de 60 nmol/mg de protéine dans des cellules du muscle lisse témoin et de 212 nmol/mg de protéine dans des cellules du muscle lisse exposées à 1 ng/ml d'IL-6 (Cheng et coll., 2005). Chez des patients asthmatiques, les niveaux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mesurés dans l'haleine sont de 0,26 ± 0,29 nM comparé à 0,01 ± 0,03 nM chez des personnes saines (Antczak et coll., 1997).

Ces données de concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> très variables relèvent probablement de la difficulté à évaluer quantitativement la présence de dérivés radicalaires de l'oxygène.

De plus, la spécificité des différentes sondes utilisées pour détecter les différents dérivés radicalaires de l'oxygène est discutable. La lucigénine et le luminol sont couramment utilisés pour détecter les dérivés radicalaires de l'oxygène (Myhre et coll., 2003). La lucigénine est rapportée comme spécifique pour l'ion superoxyde même si sa spécificité est contestée car ce produit peut également générer de l'ion superoxyde (Liochev et Fridovich, 1997) et détecter le peroxyde d'azote (Myhre et coll., 2003; Gunaydin et Demiryurek, 2001). La spécificité du luminol est également contestée car il semble détecter le peroxyde d'azote, l'ion superoxyde et l'ion hydroxyle (Castro et coll., 1996; Yildiz et coll., 1998; Nemeth et coll., 2002).

Le DCFH-DA a d'abord été décrit comme une sonde spécifique du  $H_2O_2$  (Keston et Brandt, 1965). Malgré sa grande affinité pour le  $H_2O_2$ , des rapports récents indiquent que la fluorescence du DCF pourrait également refléter la présence de peroxyde d'azote (Kooy et coll., 1997; Myhre et coll., 2003) et d'ion hydroxyle (Zhu et coll., 1994; Myhre et coll., 2003). La fluorescence du DCF peut donc être interprétée comme une mesure de la concentration du  $H_2O_2$ , étant donné que le DCF mesure essentiellement cette molécule, mais aussi comme une mesure du stress oxydatif dans la cellule.

## **2- Sources de peroxyde d'hydrogène dans les hépatocytes de lapins**

La roténone, le myxothiazole et le DPI diminuent la concentration de  $H_2O_2$  dans les hépatocytes provenant de lapins témoins et de lapins ayant une réaction inflammatoire. Ceci suggère que le complexe I et le complexe III des mitochondries ainsi que le cytochrome P450 sont des sources de  $H_2O_2$  dans les hépatocytes.

En effet, dans les hépatocytes ayant subi un dommage suite à une exposition aux xénobiotiques, à l'alcool ou à des virus, la mitochondrie et le cytochrome P450 constituent les sources principales de dérivés radicalaires de l'oxygène (Loguercio et coll., 2003). Dans le reste du foie, les cellules de Kupffer et les neutrophiles peuvent également générer des dérivés radicalaires de l'oxygène via l'enzyme NADPH oxydase.

De plus, dans la mitochondrie, le complexe I et le complexe III sont couramment cités dans la littérature comme étant les sources principales de dérivés radicalaires de l'oxygène (Turrens et coll., 1980; De Jong et Albrach, 1994; Moldovan et Moldovan, 2004; Jezek et Hlavata, 2005).

Le DPI est un inhibiteur non spécifique de flavoprotéines, inhibant entre autres, le complexe I des mitochondries, la NADPH oxydase et la synthase de monoxyde d'azote (Li et Trush, 1998). Le DPI peut également inhiber l'enzyme NADPH réductase (Zhukov et Ingelman-Sundberg, 1999) qui agit comme donneur d'électrons lors du cycle catalytique du cytochrome P450 (Lu et Coon, 1969), inhibant ainsi l'activité des isoformes du cytochrome P450 et leur capacité à générer des dérivés radicalaires de l'oxygène.

L'effet du DPI sur la concentration de  $H_2O_2$  n'est probablement pas dû à une inhibition de la NADPH oxydase, car l'apocynine, un inhibiteur spécifique de cette protéine (Zhou et coll., 1999), produit peu de changement dans la concentration de  $H_2O_2$  hépatique. Ceci suggère que la diminution de  $H_2O_2$  en présence de DPI est également due à une inhibition du complexe I des mitochondries ou à une inhibition de l'activité du cytochrome P450. Du fait de sa nature non spécifique, le DPI pourrait, en plus du complexe mitochondrial I, inhiber simultanément d'autres flavoprotéines constituant des

sources de  $H_2O_2$  comme la NADPH oxydase ou les flavoprotéines des lysosomes (Winston et coll., 1996). L'inhibition de ces différentes sources expliquerait la diminution de la concentration de  $H_2O_2$  produite par le DPI.

Il semble donc que dans les hépatocytes, le complexe I, le complexe III des mitochondries et le cytochrome P450 sont des sources de  $H_2O_2$ .

### **3- Effet du DMSO, de la roténone, du myxothiazole, du TTFA, de la fumonisine B1, du DPI et de l'apocynine sur l'activité des CYP1A2 et CYP3A6**

Nous avons montré que l'incubation des hépatocytes pendant quatre heures avec du DMSO, du TTFA ou de l'apocynine (dilués dans du DMSO) n'a aucun effet sur l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 et ceci autant dans les hépatocytes témoins que dans les hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire. La fumonisine B1 augmente l'activité du CYP1A2 dans des hépatocytes provenant de lapins témoins mais pas dans les hépatocytes provenant de lapin avec une réaction inflammatoire. Par contre, la fumonisine B1 n'exerce aucun effet sur l'activité du CYP3A6.

L'inhibition du complexe III par le myxothiazole et l'inhibition non spécifique de flavoprotéines par la DPI, s'accompagnent d'une diminution de l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6. Il est peu probable que ces diminutions d'activité soient associées à la diminution de concentration du  $H_2O_2$  observée en présence de ces produits. En effet, l'inhibition du complexe I par la roténone entraîne aussi une diminution importante de la quantité de  $H_2O_2$  mais n'a aucun effet sur l'activité du CYP1A2 autant dans les hépatocytes provenant de lapins témoins que dans les hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire. De même, la roténone est aussi efficace que le DPI pour

diminuer la concentration de  $H_2O_2$ , mais ne parvient pas à diminuer l'activité du CYP3A6 dans les mêmes proportions que le DPI.

L'inhibition de l'activité du CYP3A6 par la roténone, le myxothiazole et le DPI est donc probablement due à d'autres facteurs.

Comme mentionné précédemment, le DPI est un inhibiteur de NADPH réductase (Zhukov et Ingelman-Sundberg, 1999) et du complexe I des mitochondries (Li et Trush, 1998). La NADPH réductase est une enzyme essentielle au cycle catalytique du cytochrome P450 car elle agit comme donneur d'électrons. Comme d'autres l'ont montré, des résultats non publiés de notre laboratoire confirment que dans les hépatocytes incubés pendant quatre heures avec le DPI, l'activité de la NADPH réductase est diminuée. L'inhibition de la NADPH réductase entraîne une interruption du cycle catalytique du CYP1A2 et du CYP3A6 ce qui explique la diminution d'activité produite par le DPI.

Le myxothiazole et la roténone n'inhibent pas la NADPH réductase. Le myxothiazole est un agent fongicide dérivé de la mycobactérie *Myxococcus fulvus*, inhibant le cytochrome b-c1 qui fait partie du complexe III des mitochondries (Thierbach et Reichenbach, 1981). Plusieurs agents fongicides tels que le kétoconazole et le terconazole sont des inhibiteurs du cytochrome P450 (Rodrigues et coll., 1987; Kinobe et coll., 2006). Le myxothiazole pourrait donc être un inhibiteur non spécifique du cytochrome P450 et interagir directement avec les sites catalytiques du CYP1A2 et du CYP3A6 pour inhiber l'activité. Toutefois, aucune interaction entre le myxothiazole et le cytochrome P450 n'a été rapportée dans la littérature.

La roténone module CYP1A2 et le CYP3A6 de manière différentielle, ce qui suggère que ce produit pourrait exercer une modulation sélective de l'activité des

isoformes. Ainsi, la roténone serait un inhibiteur du CYP3A6 mais pas du CYP1A2. Ceci n'est pas impossible puisque la roténone fait partie de la famille des flavonoïdes. Plusieurs membres de cette famille comme la quercétine ou la génistéine diminuent l'activité du CYP3A4 (Moon et coll., 2006). De plus, il a été établi que la roténone inhibe l'activité d'une autre enzyme de la famille du cytochrome P450, le CYP19 communément appelé aromatasase (Sanderson et coll., 2004).

#### **4- Effet du sérum sur l'activité des CYP1A2 et CYP3A6**

Nos résultats confirment les données déjà présentes dans la littérature (Kourylko et coll., 2006; Levitchi et coll., 2004; Bleau et coll., 2000) indiquant que le sérum d'un lapin ayant une réaction inflammatoire provoque une baisse de l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire.

La diminution d'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 n'est pas associée à la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas modifiée par la présence de sérum. De plus, la roténone, le myxothiazole, le TTFA, le DPI et l'apocynine ne parviennent pas à prévenir la diminution d'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 observée en présence de sérum. Au contraire, la roténone, le myxothiazole et le DPI accentuent la diminution d'activité du CYP3A6 et le DPI celle du CYP1A2 probablement pour les raisons mentionnées plus haut.

Il est à noter que la fumonisine B1 et l'apocynine ont tendance à prévenir la diminution d'activité du CYP1A2 produite par le sérum. Leur effet n'est toutefois pas significatif suggérant que cette observation pourrait être un artéfact ou que les sources de dérivés radicalaires de l'oxygène inhibées par ces produits contribuent partiellement à la



diminution d'activité produite par le sérum. De plus, la fumonisine B1 et l'apocynine n'ont pas affecté la concentration de  $H_2O_2$ , ce qui suggère que leur effet n'est pas lié à l'inhibition de la production de  $H_2O_2$ .

La fumonisine B1 est un inhibiteur de la synthèse de céramide, l'enzyme qui catalyse la synthèse de céramide. Les céramides sont générées lors de stress cellulaire comme la réaction inflammatoire, ce qui conduit à l'apoptose.

La production de céramide est induite entre autres par les stimuli pro inflammatoires comme les cytokines IL-1, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  (Hannum, 1996). Il a été suggéré que la céramide agit comme second messenger dans l'action de ces cytokines (Chen et coll., 1995). Sous leur influence, il a été démontré que la céramide stimulait la production de dérivés radicalaires de l'oxygène dans les mitochondries de cellules endothéliales (Corda et coll., 2001).

Dans des astrocytes de rat, la céramide facilite la réponse inflammatoire ainsi que l'expression de la synthase de monoxyde d'azote et la production de  $NO^{\cdot}$  (Pahan et coll., 1998). La céramide sert également de médiateur dans plusieurs voies de signalisation cellulaire. Des analogues de céramide inhibent l'activité du PKC dans des cellules T de souris (Park et coll., 2006). La fumonisine B1 inhibe également l'activité de la protéine kinase C dans des cellules épithéliales rénales de porc. Cette inhibition est associée à une inhibition du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B et du TNF- $\alpha$  (Gopee et coll., 2003).

De plus, la céramide peut également faciliter la production d'ion superoxyde par l'enzyme NADPH oxydase. Dans des cellules endothéliales de petites artères coronaires, la céramide stimule la production d'ion superoxyde, production qui est inhibée par des inhibiteurs de la NADPH oxydase comme l'apocynine et le DPI (Zhang et coll., 2003).

Dans des hépatocytes de rats, l'inhibition de la PKC abolit l'activation de la NADPH oxydase induite par la céramide (Reinehr et coll., 2005).

En vue de ces observations, des études pourraient être réalisées pour déterminer si la fumonisine B1 inhibe la production de NO<sup>•</sup> ou la voie de signalisation du PKC qui empêcherait l'activation de la NADPH oxydase. Cette dernière hypothèse est renforcée par le fait que l'inhibition de la protéine kinase C par la bis-indolylmaléimide parvient à prévenir la diminution d'activité du CYP1A2 observée en présence de sérum (Levitchi et coll., 2004).

Nos résultats montrent que la présence de fumonisine B1 n'affecte pas la concentration de NO<sup>•</sup> dans les hépatocytes et ne parvient pas à prévenir l'augmentation de la concentration de NO<sup>•</sup> produite par le sérum de lapin avec une réaction inflammatoire. Ces résultats réfutent donc l'hypothèse d'une modulation du NO<sup>•</sup> par la fumonisine B1.

L'apocynine est un inhibiteur spécifique de la NADPH oxydase. Le fait que la présence d'apocynine ne diminue pas la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggère que la NADPH oxydase n'est pas une source importante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les hépatocytes et que cette enzyme contribue de manière limitée à l'inactivation des CYP1A2 et CYP3A6. Alternativement, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que l'ion superoxyde produit par la NADPH oxydase n'est pas rapidement converti en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et que notre mesure à l'aide du DCFH-DA ne reflète pas la production d'ion superoxyde.

La NADPH oxydase est présente dans l'hépatocyte et constitue une source de dérivés radicalaires de l'oxygène dans ces cellules. En effet, dans des hépatocytes de lapins ayant une réaction inflammatoire suite à une injection de LPS, l'activité de la NADPH oxydase et la peroxydation des lipides sont augmentées de 1 nM de MDA/mg de

protéine à 1,5 nM de MDA/mg de protéine, indiquant un stress oxydatif (Ben-Shaul et coll., 1999). De plus, dans des hépatocytes de rats, l'activité de la NADPH oxydase a été associée à la génération de dérivés radicalaires de l'oxygène lors de l'apoptose (Reinehr et coll., 2005). Ces rapports suggèrent que dans notre modèle expérimental, la réaction inflammatoire produite par la térébenthine active peu ou pas de NADPH oxydase.

L'ion superoxyde peut ne pas être rapidement converti en  $H_2O_2$ , si l'activité de l'enzyme superoxyde dismutase est faible. Dans ce cas, l'ion superoxyde provenant de la NADPH oxydase se retrouverait en plus grande quantité dans les hépatocytes et pourrait être le dérivé radicalaire de l'oxygène impliqué dans l'inactivation du CYP1A2. Il a d'ailleurs été démontré *in vitro* que l'ion superoxyde pouvait inactiver l'enzyme CYP1A1 (Flowers et Miles, 1991) et que lors de la réaction inflammatoire, l'activité de l'enzyme superoxyde dismutase était diminuée (Proulx et coll., 2000). Cependant, la courte demi-vie de l'ion superoxyde n'en fait pas une bonne molécule candidate à l'inactivation des enzymes du cytochrome P450. Nous pourrions envisager que l'ion superoxyde réagit avec le  $NO\cdot$  produisant le peroxynitrite  $ONOO^-$  qui lui serait capable d'inactiver les enzymes du cytochrome P450 (Roberts et coll., 1998).

### **5- Effet de l'interleukine-6 sur l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6**

Nos résultats suggèrent que la baisse d'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 produite par l'IL-6 n'est pas associée à la concentration de  $H_2O_2$ .

En effet, tout comme le sérum, l'ajout d'IL-6 au milieu de culture des hépatocytes n'affecte pas la concentration de  $H_2O_2$ . De même, le DMSO, la roténone, le TTFA, le

myxothiazole, la fumonisine B1, le DPI et l'apocynine ne parviennent à prévenir la baisse d'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 produite par l'IL-6.

Toutefois, dans les hépatocytes provenant de lapins témoins, la fumonisine B1 semble prévenir mais pas significativement la diminution d'activité du CYP1A2 produite par l'IL-6. Comme discuté auparavant, l'effet de la fumonisine B1 est attribuable à l'inhibition de la PKC.

L'ensemble de ces résultats suggère que le  $H_2O_2$  provenant des mitochondries et de la NADPH oxydase n'est pas impliqué dans la diminution d'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 causées par le sérum et l'IL-6. Ceci n'exclut pas l'implication d'autres dérivés radicalaires de l'oxygène ou l'implication d'autres sources de  $H_2O_2$  dans ces diminutions d'activité. Ceci n'exclut pas non plus, que le  $H_2O_2$  joue un rôle à plus long terme dans les changements d'expression du CYP1A2 et du CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire.

#### **6- Implication d'autres dérivés radicalaires dans la diminution d'activité des isoformes du cytochrome P450**

A part le  $H_2O_2$ , Il existe d'autres dérivés radicalaires pouvant également affecter l'activité des isoformes CYP1A2 et CYP3A6 tels que l'ion superoxyde qui a déjà été discuté. Pendant une réaction inflammatoire, la production de monoxyde d'azote est augmentée. *In vitro*, des études ont démontré que la présence de nitroprussiate de sodium, une source de  $NO^{\cdot}$ , diminuait l'activité du CYP1A2 dans les hépatocytes témoins (El-Kadi et coll., 2000). Dans des hépatocytes provenant d'un lapin avec une réaction inflammatoire, le nitroprussiate de sodium diminue l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 (Levitchi, 2004). *In vivo*, le L-nitro arginine méthyl ester (L-NAME), un inhibiteur de la

synthase du monoxyde d'azote, prévient partiellement la diminution d'activité du CYP1A2 observée chez le lapin avec une réaction inflammatoire (Barakat et coll., 2001).

Contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, nous avons observé que la concentration de NO $\cdot$  dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire était semblable à celle mesurée dans les hépatocytes de lapins témoins. De même, l'interleukine-6 n'a pas produit d'augmentation de la concentration de NO $\cdot$ . Nous n'avons pas d'explications sur ces différences. Par ailleurs, nous avons observé que la quantité de NO $\cdot$  dans le surnageant était augmentée lorsque les hépatocytes avec réaction inflammatoire étaient incubés avec du sérum, observation réalisée dans d'autres études (Levitchi et coll., 2004; Kourylko, 2006). Cette augmentation de NO $\cdot$  par le sérum n'a pas été prévenue par la roténone, le myxothiazole, le TTFA, la fumonisine B1, le DPI ou l'apocynine.

La diminution d'activité du cytochrome P450 a déjà été associée à l'augmentation de la concentration de NO $\cdot$  dans les hépatocytes (Takemura et coll., 1999, Ferrari et coll., 2001). *In vitro*, dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire, le L-NAME prévient l'augmentation de NO $\cdot$  produite par le sérum et l'IL-6 et prévient partiellement la diminution d'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 produite par le sérum et l'IL-6 (Levitchi et coll., 2004; Kourylko et coll., 2006), ce qui suggère que le NO $\cdot$  est un des facteurs qui contribuent à la diminution de l'activité des isoformes.

Un autre dérivé radicalaire susceptible de diminuer l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 est le peroxydinitrite (ONOO $\cdot$ ). Cet ion est le produit de la réaction entre l'ion superoxyde et le NO $\cdot$ . Sa formation dépend de l'équilibre entre la formation de

superoxyde, l'activité de la superoxyde dismutase et la production de  $\text{NO}^\bullet$  (Koppenol, 1998). Le peroxy-nitrite induit l'oxydation ou la nitration de molécules. Il a été démontré que le peroxy-nitrite modifie l'apoprotéine du cytochrome P450 induisant une perte de l'activité (Roberts et coll., 1998; Daiber et coll., 2000; Vuppugalla et Mehvar, 2004). Le peroxy-nitrite peut également inhiber l'activité de l'enzyme NADPH réductase (Sergeeva et coll., 2001). Une telle interaction aurait pour conséquence l'inhibition de l'activité du cytochrome P450.

Le peroxy-nitrite est un candidat potentiel à l'inhibition du cytochrome P450 parce que les inhibiteurs de la formation du superoxyde, et des inhibiteurs de la formation du  $\text{NO}^\bullet$  préviennent la diminution d'activité observée en présence de sérum (El-Kadi et coll., 2000); dans cette étude les inhibiteurs de la NADPH oxydase semblaient prévenir la diminution d'activité du CYP1A2.

L'ion superoxyde pourrait réagir rapidement avec le  $\text{NO}^\bullet$  ce qui laisserait peu de superoxyde disponible pour être converti en  $\text{H}_2\text{O}_2$  par l'enzyme superoxyde dismutase. Lors de la réaction inflammatoire chez le lapin, suite à l'injection de térébenthine, la concentration de  $\text{NO}^\bullet$  est augmentée de 1000% (Levitchi et coll., 2004), tandis que l'activité du superoxyde dismutase est diminuée de 12% (Proulx et du Souich, 1995) et la concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est augmentée de 66%. La réaction entre le  $\text{NO}^\bullet$  et le superoxyde étant trois fois plus rapide que la dismutation du superoxyde qui produit le  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kelm et coll., 1997), il est donc possible que dans les hépatocytes, l'ion superoxyde réagisse préférentiellement avec le  $\text{NO}^\bullet$  qui se retrouve en plus grande quantité et qu'en conséquence la concentration de  $\text{ONOO}^\bullet$  s'en trouve augmentée.

## **7- Autres sources de dérivés radicalaires de l'oxygène et de NO<sup>•</sup> dans l'hépatocyte**

Dans la cellule, il existe de nombreuses sources de radicaux libres et nous ne les avons pas examinées toutes. Par exemple, la xanthine oxydase est une source importante de dérivés radicalaires de l'oxygène. Il a été démontré que l'interféron augmente l'activité de la xanthine oxydase chez les rongeurs (Cribb et Renton, 1993). De même, dans des hépatocytes de lapins ayant reçu une injection de térébenthine, l'activité de la xanthine oxydase est augmentée de presque 200% (Proulx et du Souich, 1995). Par contre chez les rats, la xanthine oxydase ne joue pas un rôle dans l'inactivation du CYP450 par l'interféron (Cribb et Renton, 1993).

Le NO<sup>•</sup> peut être synthétisé à partir de la synthase de monoxyde d'azote (NOS), mais aussi à partir du cytochrome P450. En plus de générer de l'ion superoxyde, le cytochrome P450 peut générer du NO<sup>•</sup> à partir de la sérotonine. Les isoformes CYP2C9, CYP1A2 et CYP2B6 peuvent biotransformer la sérotonine en hydroxylamine qui est convertie en NO<sup>•</sup> en présence de catalase (Fradette et coll., 2004). Cependant, le cytochrome P450 étant diminué lors d'une réaction inflammatoire, il est peut probable qu'il puisse servir de source aux différents radicaux libres influençant son activité. Quant à la NOS, cette enzyme est exprimée sous trois formes : la NOS neuronale (nNOS), la forme endothéliale (eNOS) et la forme inductible (iNOS) qui est induite lors de la réaction inflammatoire (Dudzinski et coll., 2006). Les mitochondries peuvent aussi générer du NO<sup>•</sup> via une NOS mitochondriale (Jezek et Hlavata, 2005). Le rôle de la NOS dans l'inactivation du cytochrome P450 mérite donc d'être plus amplement étudié.

## 8- Mécanismes d'action des dérivés radicalaires de l'oxygène

Qu'il s'agisse du  $\text{H}_2\text{O}_2$ , du  $\text{NO}\cdot$ , du  $\text{ONOO}\cdot$  ou du  $\text{O}_2\cdot^-$ , les mécanismes d'inactivation par lesquels ces dérivés radicalaires agissent sur le cytochrome P450 restent incertains. Les dérivés radicalaires de l'oxygène pourraient interagir de manière directe avec la protéine ou de manière indirecte à travers l'activation de voies de signalisation impliquant des MAP kinases.

Le  $\text{NO}\cdot$  pourrait inactiver la protéine de trois manières. Premièrement, en interagissant directement avec des résidus de cystéine sur le site actif de l'enzyme (Minamiyama et coll., 1997). Deuxièmement, en se liant avec le superoxyde pour former le peroxy-nitrite qui va induire la nitration de résidus de tyrosine à des sites importants pour l'activité de l'enzyme (Roberts et coll., 1998). Finalement, le  $\text{NO}\cdot$  peut se lier à l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  du domaine hème du cytochrome P450 (Minamiyama et coll., 1997). Le peroxy-nitrite peut réagir avec les groupes thiols des résidus de cystéine ou de tyrosine du cytochrome P450 et les oxyder (Vuppugalla et Mehvar, 2004; Kinobe et coll., 2004; Ducrocq et coll., 1999). Les résidus de cystéine et de tyrosine pourraient également subir une nitration (Ducrocq et coll., 1999). De plus, l'ion peroxy-nitrique peut non seulement réagir avec les acides aminés du cytochrome P450 mais aussi avec ceux de l'enzyme NADPH réductase qui contient également des groupes thiols (Sergeeva et coll., 2001; Slepneva et coll., 1995).

Il a été démontré que dans des hépatocytes incubés pendant quatre heures avec du sérum de lapin ayant une réaction inflammatoire, la nitration des résidus de tyrosine des isoformes du cytochrome P450 n'était pas augmentée comparé à des hépatocytes incubés avec du sérum de lapin témoin. Plus spécifiquement, le sérum de lapin témoin augmente



la nitrosation du CYP3A6 du CYP1A2 autant que le sérum de lapin ayant une réaction inflammatoire. De plus, le sérum d'humain avec une infection virale n'augmente pas la nitrosation de ces isoformes, même s'il diminue leur activité. Ceci suggère que la nitration des tyrosines n'est pas le mécanisme par lequel les CYP1A2 et CYP3A6 sont inactivés par le NO $\cdot$  (Kourylko et coll., 2006).

Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut également réagir avec l'ion Fe<sup>3+</sup> du domaine hème du cytochrome P450 (Archakov et coll., 1998). Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourrait théoriquement oxyder des résidus de tyrosine ou de cystéine sur les protéines (voir introduction). Cependant, la présence d'une telle interaction n'a pas encore été démontrée *in vitro* ou *in vivo*.

Les dérivés radicalaires, tels que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le O<sub>2</sub> $\cdot^-$ , le NO $\cdot$  et le ONOO $\cdot$ , étant également des molécules de signalisation (voir introduction), il est possible que leur effet sur l'activité du cytochrome P450 soit dû à l'activation de voies de signalisation en particulier de certaines kinases. Les kinases activées pourraient phosphoryler les isoformes du cytochrome P450. Ainsi, il a été rapporté que les voies de signalisation modulant l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6 impliquent les 'Janus Activated kinases' (JAK), les tyrosines kinases, le ERK1/2 et la protéine kinase C (Levitchi et coll., 2004; Kourylko et coll., 2006). Ces protéines sont toutes susceptibles d'être modulées par les dérivés radicalaires.

Enfin, les dérivés radicalaires de l'oxygène, surtout le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pourraient agir à plus long terme au niveau de l'expression des isoformes du cytochrome P450. En effet, les dérivés radicalaires de l'oxygène sont capables d'activer plusieurs facteurs de transcription impliqués dans le maintien du processus inflammatoire, comme le NF- $\kappa$ B (Schreck et coll., 1991) et l'AP-1 (Rao et coll., 1996). En effet, la suppression de la

transcription du gène *CYP2C11* par l'IL-1 est modulée par le NF- $\kappa$ B (Iber et coll., 2000). De même, le TNF- $\alpha$  diminue l'expression de l'enzyme CYP1A1 via l'activation du NF- $\kappa$ B (Ke et coll., 2001). De plus, dans des foies de souris ayant une réaction inflammatoire suite à l'injection de lipopolysaccharides, il a été démontré que les formes radicalaires de l'oxygène diminuaient l'ARN messenger du récepteur nucléaire *PXR* puis l'ARN messenger du *CYP3A11* (Xu et coll., 2004). Enfin, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminue l'ARN messenger du *CYP1A1* via l'inhibition de l'activité du facteur de transcription NFI (Morel et coll., 1999).

Il est apparent dans nos résultats, que le CYP1A2 et le CYP3A6 réagissent différemment à la présence des inhibiteurs utilisés. Par exemple, la roténone qui diminue l'activité du CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire, n'exerce aucun effet sur le CYP1A2. De même, la fumonisine B1 et l'apocynine qui ont tendance à augmenter l'activité du CYP1A2 dans ces mêmes hépatocytes, n'affectent pas l'activité du CYP3A6. On peut expliquer ces observations de plusieurs manières.

Premièrement, la roténone pourrait être un inhibiteur sélectif du CYP3A6 mais pas du CYP1A2 comme mentionné plus haut.

Deuxièmement, il a été rapporté que la fumonisine B1 bloquait la production de superoxyde en inhibant la production de céramide qui elle activait la NADPH oxydase (Yi et coll., 2004). Par ailleurs, l'apocynine est un inhibiteur spécifique de la NADPH oxydase (Zhou et coll., 1999). Ceci permet de croire que le CYP1A2 serait plus vulnérable à l'ion superoxyde produit par la NADPH oxydase que le CYP3A6.

Enfin, un changement dans la signalisation n'aurait pas nécessairement les mêmes répercussions sur l'activité du CYP1A2 et du CYP3A6. Des observations spectroscopiques ont démontré que le CYP1A2 possède une conformation stable et un site actif rigide tandis que l'enzyme CYP3A4 recombinée (l'équivalent humain du CYP3A6) se dénature plus facilement et est dotée d'un site actif plus flexible. Ceci expliquerait pourquoi la roténone inhibe le CYP3A6 et pas le CYP1A2 (Azenbacherova et coll., 2000; Azenbacher et coll., 1998).

Nous avons démontré dans cette étude que la concentration des dérivés radicalaires de l'oxygène, en particulier du peroxyde d'hydrogène, dans les hépatocytes est augmentée lors de la réaction inflammatoire induite par l'injection de térébentine chez le lapin. Ces dérivés proviennent des complexes I et III de la chaîne respiratoire des mitochondries ainsi que du cytochrome P450. L'augmentation de la concentration de peroxyde d'hydrogène n'est pas associée à la diminution d'activité des isoformes du cytochrome P450 CYP1A2 et CYP3A6 produite par le sérum et par l'interleukine-6. Toutefois, la diminution d'activité des isoformes du cytochrome P450 est prévenue par des antioxydants comme la N-acétylcystéine et le DMTU et partiellement prévenue par le L-NAME, un inhibiteur de la NOS. Pour expliquer ce fait, nous croyons que l'agent inhibiteur du cytochrome P450 est le peroxyde d'azote,  $\text{ONOO}^\cdot$ , produit de la réaction entre le superoxyde et le  $\text{NO}^\cdot$ . Ceci explique pourquoi le  $\text{H}_2\text{O}_2$  ne reflète probablement pas adéquatement l'effet du peroxyde d'azote sur le cytochrome P450.

Le peroxy-nitrite pourrait agir soit en se liant à l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  du domaine hème du cytochrome P450, soit en réagissant avec des résidus de cystéine sur le site actif des isoformes ou enfin, en inactivant l'enzyme NADPH réductase qui détermine l'étape limitante du cycle catalytique des isoformes du cytochrome P450 (Figure 36).

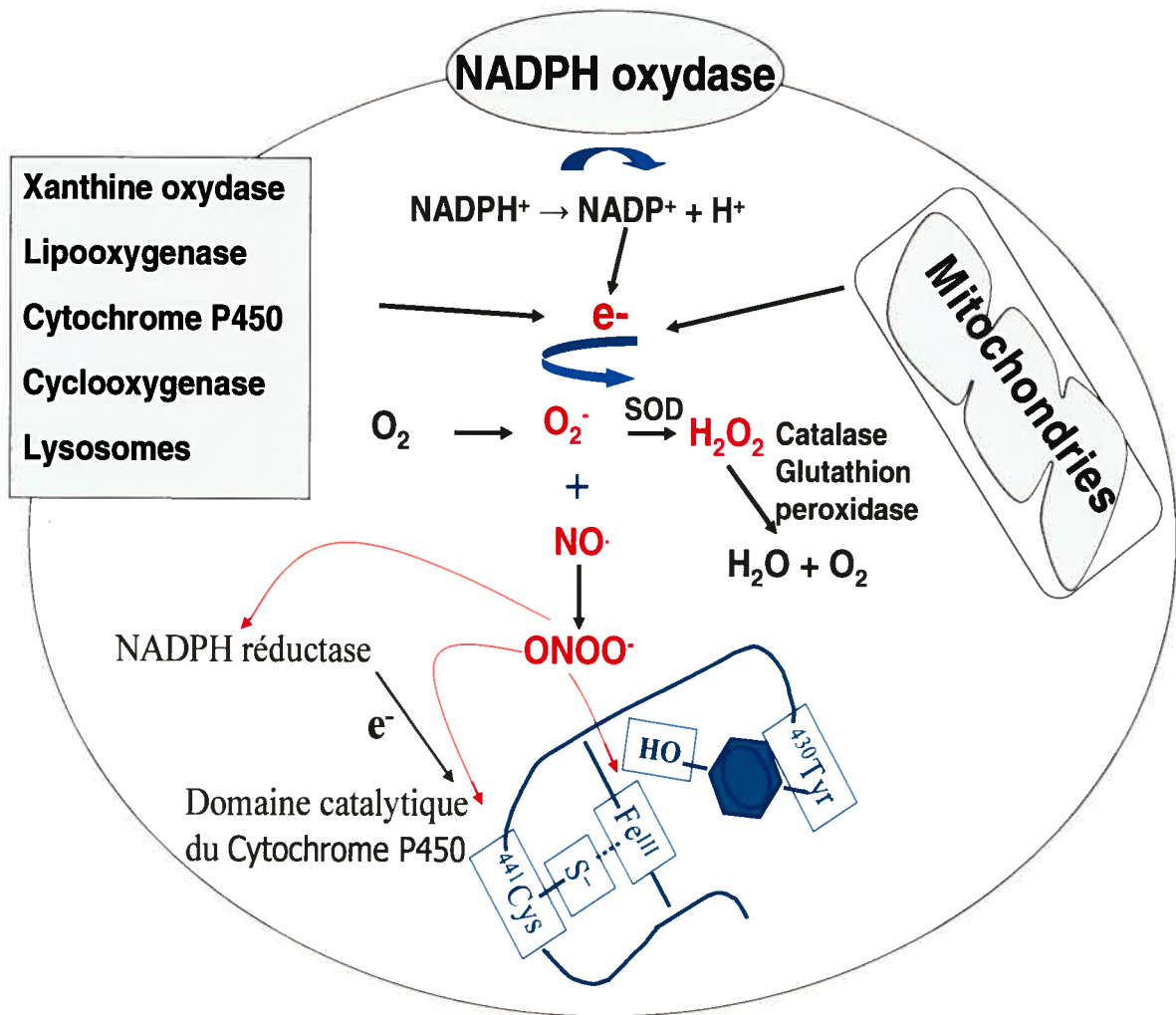


Figure 36. Sources possibles et mécanismes d'action proposés pour l'inactivation des isoformes du cytochrome P450 par la peroxynitrite (SOD : superoxyde dismutase)

## BIBLIOGRAPHIE

Abe, J, and Berk BC (1999) Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 274: 21003-21010.

Adcock IM, Brown CR, Kwon O, and Barnes PJ (1994) Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 1518 – 1524.

Ago T, Nunoi H, Ito T and Sumimoto H (1999). Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the sh3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem.* 274: 33644–33653.

Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, and Yazaki Y (1997). Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 100: 1813-1821.

Aitken AE, Richardson TA, Morgan ET (2006). Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:123-149

Akinyinka O, Sowunmi A, Honeywell R and Renwick AG (2000). The effects of acute falciparum malaria on the disposition of caffeine and the comparison of saliva and plasma-derived pharmacokinetic parameters in adult Nigerians. *Eur J Clin Pharmacol* 56: 159-165.

Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keranen ML, Tarvainen I, Haltia T, Nilsson L, Binzer M, Forsgren L and Marklund SL (1995) Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 10: 61–66

Antczak A, Nowak D, Shariati B, Krol M, Piasecka G and Kurmanowska Z (1997). Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Resp J.* 10(6): 1235-1241

Anzenbacher P., Bec N., Hudeý cek J., Lange R. and Anzenba-cherová E (1998). High conformational stability of cytochrome P450 1A2: evidence from UV absorption spectra. *Coll. Czech.Chem. Commun.* 63: 441–448.

Anzenbacherova E, Bec N, Anzenbacher P, Hudecek J, Soucek P, Jung C, Munro AW, Lange R (2000). Flexibility and stability of the structure of cytochromes P450 3A4 and BM-3. *Eur J Biochem.* 267(10):2916-2920.

Archakov AI, Zgoda VG and Karuzina II (1998). Oxidative modification of cytochrome P450 and other macromolecules during its turnover. *Vopr Med Khim* 44: 3-27.

Axelrod J (1982). The discovery of the microsomal drug-metabolizing enzymes. *Trends Pharmacol Sci* 3:383–386

Babior BM (2004). NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 16(1):42-47.

Baer AN, McAllister CB, Wilkinson GR, Woosley RL, & Pincus T.(1986). Altered distribution of debrisoquine oxidation phenotypes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 29: 843–850.

Barakat M & du Souich P (1996). Effect of nifedipine on the elimination of theophylline in the rabbit subjected to hypoxia or to an inflammatory reaction. *J Pharm Pharmacol* 48: 906–910.

Barja G (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 31, 347–366.

Barker CW, Fagan JB, Pasco DS (1992) Interleukin-1 beta suppresses the induction of P4501A1 and P4501A2 mRNAs in isolated hepatocytes. *J Biol Chem.* 267(12):8050-8055

Bebia Z, Buch SC, Wilson JW, Frye RF, Romkes M, Cecchetti A, Chaves-Gnecco D, Branch RA (2004) Bioequivalence revisited: influence of age and sex on CYP enzymes. *Clin Pharmacol Ther.* 76(6):618-627.

Beigneux AP, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR (2002) Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. *Biochem Biophys Res Commun.* 293(1):145-149.

Ben-Shaul V, Sofer Y, Bergman M, Zurovsky Y, Grossman S (1999). Lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the liver: comparison between rat and rabbit. *Shock.* 12(4):288-93.

Bertilsson L (1995) Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet.* 29(3):192-209.

Bertz RJ, Granneman GR (1997). Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin. Pharmacokinet.* 32, 210-258.

Bleau AM, Fradette C, El-Kadi AO, Cote MC, du Souich P (2001) Cytochrome P450 down-regulation by serum from humans with a viral infection and from rabbits with an inflammatory reaction. *Drug Metab Dispos.* 29(7):1007-1012.

Bleau AM, Levitchi MC, Maurice H, du Souich P (2000) Cytochrome P450 inactivation by serum from humans with a viral infection and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammation: the role of cytokines. *Br J Pharmacol.* 130(8):1777-1784.



Bleau AM, Maurel P, Pichette V, Leblond F, du Souich P (2003) Interleukin-1beta, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1, 1A2 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 473(2-3):197-206.

Brar SS, Kennedy TP, Whorton AR, Murphy TM, Chitano P, Hoidal JR (1999). Requirement for reactive oxygen species in serum-induced and platelet-derived growth factor-induced growth of airway smooth muscle. *J Biol Chem.* 274(28):20017-20026.

Brodie BB, Gillette JR, and La Du B (1958). Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Annu Rev Biochem* 27:427-454.

Burke-Wolin T, Abate CJ, Wolin MS, Gurtner GH (1991) Hydrogen peroxide-induced pulmonary vasodilation: role of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Am J Physiol.* 261: 393-398.

Calleja C, Eeckhoutte C, Dacasto M, Larrieu G, Dupuy J, Pineau T, Galtier P (1998) Comparative effects of cytokines on constitutive and inducible expression of the gene encoding for the cytochrome P450 3A6 isoenzyme in cultured rabbit hepatocytes: consequences on progesterone 6beta-hydroxylation. *Biochem Pharmacol.* 56(10):1279-1285.

Carelli M, Porras MC, Rizzardini M, Cantoni L (1996) Modulation of constitutive and inducible hepatic cytochrome(s) P-450 by interferon beta in mice. *J Hepatol.* 24(2):230-237.

Chance B and Williams GR (1954). Kinetics of cytochrome b5 in rat liver microsomes. *J Biol Chem* 209:945-951.

Castro L, Alvarez MN, Radi R (1996). Modulatory role of nitric oxide on superoxide-dependent luminol chemiluminescence. *Arch Biochem Biophys.* 333:179-188.

Chang KC, Bell TD, Lauer BA, Chai T (1978). Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness. *Lancet* 1(8074): 1132-1133.

Chang KC, Bell TD, Lauer BA, Renton KW (1978). Theophylline pharmacokinetics in respiratory viral illness. *Lancet* 2(8081): 160-161.

Chauret N, Tremblay N, Lackman RL, Gauthier JY, Silva JS, Marois J *et al* (1999). Description of a 96-well plate assay to measure P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Anal Biochem.* 276: 215-225.

Cheng L, Cao W, Fiocchi C, Behar J, Biancani P, Harnett KM (2005). In vitro model of acute esophagitis in the cat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 289(5):G860-869.

Cheng PY, Morgan ET (2001). Hepatic cytochrome P450 regulation in disease states. *Curr Drug Metab* 2(2):165-183.

Clark MA, Bing BA, Gottschall PE, Williams JF (1995). Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-methylcholanthrene induction of P450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 49(1):97-104.

Cooper DY, Levin S, Narasimhulu S, Rosenthal O, and Estabrook RW (1965). Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science (Wash DC)* 147: 400-402.

Corda S, Laplace C, Vicaut E, Duranteau J (2001). Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 24(6):762-768.

Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins (1999). *Pathologic Basis of Disease*. 6th ed. Philadelphia :Saunders: 50-88.

Coulom H, Birman S (2004). Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*. 24(48):10993-10998.

Craig PI, Tapner M, Farrell GC (1993). Interferon suppresses erythromycin metabolism in rats and human subjects. *Hepatology*. 17(2):230-235.

Crawford, D., Amstad, P., Zbinden, I. and Cerutti, P. A. (1988). *Oncogene* 3: 27-32.

Cribb AE and Renton KW (1993). Dissociation of xanthine oxidase induction and cytochrome P450 depression during interferon induction in the rat. *Biochem Pharmacol* . 46: 2114-2117.

Dai Y, Rashba-Step J and Cederbaum AI (1993). Stable expression of human cytochrome P4502E1 in HepG2 cells: Characterization of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates. *Biochemistry* 32: 6928-6937.

Daiber A, Herold S, Schoneich C, Namgaladze D, Peterson JA, Ullrich V (2000). Nitration and inactivation of cytochrome P450BM-3 by peroxynitrite. Stopped-flow measurements prove ferryl intermediates. *Eur J Biochem*. 267(23):6729-6739.

De Jong AMP and Albrach SPJ (1994). Ubisemiquinone as obligatory intermediate in the electron transfer from NADH to ubiquinone. *Eur. J. Biochem*. 222:975-982

Delaporte E, Renton KW (1997). Cytochrome P4501A1 and cytochrome P4501A2 are downregulated at both transcriptional and post-transcriptional levels by conditions resulting in interferon-alpha/beta induction. *Life Sci*. 60(10):787-796.

- Devary Y, Gottlieb RA, Lau LF, Karin M (1991). Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol Cell Biol.* 11(5):2804-2811.
- Dickins M (2004). Induction of cytochromes P450. *Curr Top Med Chem.* 4(16):1745-66.
- Dinareello CA (1994). The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 8(15): 1314-1325.
- Drukarch B, van Muiswinkel FL (2001) Neuroprotection for Parkinson's disease: a new approach for a new millennium. *Expert Opin Investig Drugs* (10):1855-1868.
- Dubrulle J et Pourquié O (2004). Coupling segmentation to axis formation. *Development* 131 : 5783-5793.
- Ducrocq C, Blanchard B, Pignatelli B, Ohshima H (1999). Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell Mol Life Sci.* 55:1068-1077
- Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T (2006). The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:235-276.
- El-Kadi AO, Bleau AM, Dumont I, Maurice H, du Souich P (2000). Role of reactive oxygen intermediates in the decrease of hepatic cytochrome P450 activity by serum of humans and rabbits with an acute inflammatory reaction. *Drug Metab Dispos.* 28(9): 1112-1120.
- El-Kadi AO, Maurice H, Ong H, du Souich P (1997). Down-regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of mediators in human and animal serum and in the liver. *Br J Pharmacol.* 121(6): 1164-1170.
- Esposito, F, Agosti V, Morrone G, Morra F, Cuomo C, Russo T, Venuta S, and Cimino F (1994). Inhibition of the differentiation of human myeloid cell lines by redox changes induced through glutathione depletion. *Biochem J* 301: 649-653.
- Evans WE, Relling MV (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286: 487-491.
- Farrell G (1999). Effects of disease on expression and regulation of CYPs *Mol Aspects Med* 20(1-2): 55-70.
- Ferrari L, Peng N, Halpert JR, and Morgan ET (2001) Role of nitric oxide in down-regulation of CYP2B1 protein, but not RNA, in primary cultures of rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 60: 209-216.
- Fleming I (2001). Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res.* 89(9): 753-762.
- Flowers NL and Miles PR (1991). Alterations of pulmonary benzo[a]pyrene metabolism by reactive oxygen metabolites. *Toxicology* 68: 259-274.

Fradette C, Yamaguchi N, Du Souich P (2004). 5-Hydroxytryptamine is biotransformed by CYP2C9, 2C19 and 2B6 to hydroxylamine, which is converted into nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 141(3):407-14.

Fukuda T, Nishida Y, Imaoka S, Hiroi T, Naohara M, Funae Y and Azuma J (2000). The decreased in vivo clearance of CYP2D6 substrates by CYP2D6\*10 might be caused not only by the low-expression but also by low affinity of CYP2D6. *Arch. Biochem. Biophys*. 380: 303–308.

Fukuda Y, Ishida N, Noguchi T, Kappas A, Sassa S (1992). Interleukin-6 down regulates the expression of transcripts encoding cytochrome P450 IA1, IA2 and IIIA3 in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 184(2): 960-965.

Fukuda Y, Sassa S (1994). Suppression of cytochrome P450IA1 by interleukin-6 in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem Pharmacol*. 47(7): 1187-1195.

Funk CD (2001). Prostaglandins and leucotriènes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 294: 1871–1875.

Gille L, Nohl H (2000). The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone. *Arch Biochem Biophys* 375: 347–354.

Goldman R, Ferber E, Meller R, Zor U (1994). A role for reactive oxygen species in zymosan and beta-glucan induced protein tyrosine phosphorylation and phospholipase A2 activation in murine macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1222(2): 265-276.

Goldman R, Zor U (1994). Activation of macrophage PtdIns-PLC by phorbol ester and vanadate: involvement of reactive oxygen species and tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 199(1): 334-338.

Gopee NV, He Q, Sharma RP (2003). Fumonisin B1-induced apoptosis is associated with delayed inhibition of protein kinase C, nuclear factor-kappaB and tumor necrosis factor alpha in LLC-PK1 cells. *Chem Biol Interact* 146(2):131-145.

Greenblatt DJ, Patki KC, von Moltke LL, Shader RI (2001). Drug interactions with grapefruit juice: an update. *J Clin Psychopharmacol* 21:357-359.

Griendling, K. K., Sorescu, D., Lassegue, B., and Ushio-Fukai, M (2000). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 20: 2175 – 2183.

Grover, AK, and Samson SE (1988). Effect of superoxide radical on Ca<sup>2+</sup> pumps of coronary artery. *Am J Physiol Cell Physiol* 255: C297-C303.

Grover, AK, Samson SE, and Fomin VP (1992). Peroxide inactivates calcium pumps in pig coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 263: H537-H543.

- Guengerich FP (2003). Cytochromes P450, drugs and diseases. *Mol. Interv.* 3:194–202
- Gunaydin B, Demiryurek AT (2001). Interaction of lidocaine with reactive oxygen and nitrogen species. *Eur J Anaesthesiol.* 18:816–822.
- Guyton KZ, Lui Y, Gorospe M, Xu Q. and Holbrook, NJ. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 271(8): 4138-4142.
- Haeflner-Cavaillon N (1998). La réponse inflammatoire première partie *Rev Med Interne.* 19 : 585-588.
- Hakkola J, Hu Y, Ingelman-Sundberg M (2003). Mechanisms of down-regulation of CYP2E1 expression by inflammatory cytokines in rat hepatoma cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 304(3):1048-1054.
- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D & Cadenas E (2003). Voltage dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 278: 5557–5563.
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans.* 29(2):345-350.
- Hannun YA (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274 (5294): 1855–1859.
- Haugen DA and Coon MJ (1976). Properties of electrophoretically homogeneous phenobarbital-inducible and  $\beta$ -naphthoflavone-inducible forms of liver microsomal cytochrome P-450. *J BiolChem* 251: 7929–7939.
- Haugen DA, van der Hoeven TA, and Coon MJ (1975) Purified liver microsomal cytochrome P-450. Separation and characterization of multiple forms. *J Biol Chem* 250:3567–3570.
- Hayaishi O (1962). History and scope, in *Oxygenases* (Hayaishi O ed):1–29, Academic Press, New York.
- Hayaishi O, Katagiri M, and Rothberg S (1955). Mechanism of the pyrocatechase reaction. *J AmChem Soc* 77: 5450–5451.
- Henschke, PN, and Elliott SJ (1995). Oxidized glutathione decreases luminal Ca<sup>2+</sup> content of the endothelial cell Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup> store. *Biochem J* 312: 485-489.
- Hirota, K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, and Yodoi J (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3633-3638.

Hirota, K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, and Yodoi J (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF- kappaB. *J Biol Chem* 274: 27891-27897.

Iber H, Chen Q, Cheng PY, Morgan ET (2000) Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukin-1 mediated by NF-kappaB binding at the transcription start site. *Arch Biochem Biophys*. 377(1):187-94. Erratum in: *Arch Biochem Biophys* 2001 Apr 1;388(1):178.

Imai Y and Sato R (1966). Evidence for two forms of P-450 hemoprotein in microsomal membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 23:5-11.

Ingelman-Sundberg (2002). Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology*. 181-182:447-452.

Ishikawa M, Sasaki K, & Yakayanagi Y. (1990). Modulation of zoxazolamine metabolism in carrageenan-induced inflammation in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 70: 367- 370.

Jezek P, Hlavata L. (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol*. 37(12):2478-503.

Kadota S, Fantus IG, Deragon G, Guyda HJ, Posner BI (1987) Stimulation of insulin-like growth factor II receptor binding and insulin receptor kinase activity in rat adipocytes. Effects of vanadate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 262(17):8252-8256.

Ke S, Rabson AB, Germino JF, Gallo MA, Tian Y (2001). Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 276(43):39638-39644.

Kelm M, Dahmann R, Wink D and Feelisch M (1997). The nitric oxide:superoxide assay. *J. Biol. Chem*. 272: 9922-9932

Keston AS and Brandt R (1965). The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal biochem* 11:1-5.

Kinnula VL (2005) Production and degradation of oxygen metabolites during inflammatory states in the human lung. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 4(4):465-70.

Kinobe R, Ji Y, Nakatsu K (2004). Peroxynitrite-mediated inactivation of heme oxygenases. *BMC Pharmacol*. 4(1):26.

Kinobe RT, Dercho RA, Vlahakis JZ, Brien JF, Szarek WA, Nakatsu K (2006). Inhibition of the enzymatic activity of heme oxygenases by azole-based antifungal drugs. *J Pharmacol Exp Ther*.

- Klingenberg M (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75:376–386.
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H (1997). Oxidation of 20,70-dichlorofluorescein by peroxynitrite. *Free Radic Res.* 27:245–254.
- Koppenol WH. (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 385–391
- Koren G and Greenwald M (1985). Decrease in theophylline clearance causing toxicity during viral epidemics *J asthma* 22:75-79.
- Kotlyar M, Carson SW (1999). Effects of obesity on the cytochrome P450 enzyme system. *Int J Clin Pharmacol Ther* 37(1):8-19.
- Kourylko O, Fradette C, Arcand M, du Souich P (2006). Modulation of CYP1A2 and CYP3A6 catalytic activities by serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction and interleukin 6. *Drug Metab Dispos.* 34(1): 27-35.
- Kraemer MJ, Furukawa CT, Koup JR, Shapiro GG, Pierson WE, Bierman CW (1982). Altered theophylline clearance during an influenza B outbreak. *Pediatrics* 69(4): 476-80.
- Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF (1986). PGH synthetase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res.* 59: 612–619.
- Lazarou JL, Pomeranz BH and Corey PN (1998). Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 279: 1200-1205.
- Lebel CP, Ischiropoulos H and Bondy SC (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 227-231.
- Lefebvre P, Martin PJ, Flajollet S, Dedieu S, Billaut X et Lefebvre B (2005). Transcriptional activities of retinoid acid receptor. *Vitamins and hormones* 70: 199-264.
- Le Stunff H, Galve-Roperh I, Peterson C, Milstien S, Spiegel S (2002). Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J Cell Biol.* 158(6):1039-1049.
- Levitchi M, Fradette C, Bleau AM, Michaud D, Kourylko O, Arcand M, du Souich P (2004). Signal transduction pathways implicated in the decrease in CYP1A1, 1A2 and 3A6 activity produced by serum from rabbits and humans with an inflammatory reaction. *Biochem Pharmacol.* 68(3): 573-582.

Lewis DF (2004). 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics*. 5(3): 305-318.

Li Qiutang, and Verma, I M (2002). NF-kB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 725 – 734.

Li Y, Trush MA (1998). Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun.* 253(2): 295-299.

Liochev SI, Fridovich I (1997). Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys.* 337:115–120.

Liu JQ, Folz RJ (2004). Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287(1):L111-118.

Loguercio C, Federico A (2003). Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med.* 34(1):1-10.

Lotan R (1996). Retinoids in cancer chemoprevention, *FASEB J* 10(9): 1031–1039.

Loub WD, Wattenberg LW, Davis DW (1975). Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in rat tissues by naturally occurring indoles of cruciferous plants. *J Natl Cancer Inst.* 54(4):985-88

Lu AYH and Coon MJ (1968) Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J Biol Chem* 243:1331–1332.

Lu AYH, Junk KW, and Coon MJ (1969). Resolution of the cytochrome P-450-containing omega-hydroxylation system of liver microsomes into three components. *J Biol Chem* 244: 3714–3721.

Machida K, Tanaka T, Fujita K, Taniguchi M (1998). Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 180(17): 4460-4465.

Marshall (1997). Getting the right drug into the right patient. *Nature Biotechnol.* 15 pp. 1249–1252.

Mason HS (1957). Mechanisms of oxygen metabolism, in *Advances in Enzymology* (Nord FF ed)pp 79–234, Academic Press, New York.

Mason HS, Fowlks WL, and Peterson E (1955). Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J Am Chem Soc* 77: 2914–2915.



Matsuno-Yagi A, Hatefi Y (2001). Ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase (complex III). Effect of inhibitors on cytochrome b reduction in submitochondrial particles and the role of ubiquinone in complex III. *J Biol Chem.* 276(22):19006-19011.

Maurel P (1996). The CYP3A family, in: Ioannides C (ed.), *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. Boca Raton, FL: CRC Press; 241-270.

Mayo PR, Skeith K, Russell AS, & Jamali F (2000). Decreased dromotropic response to verapamil despite pronounced increased drug concentration in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol* 50: 605–613.

McCabe BJ (2004). Prevention of food-drug interactions with special emphasis on older adults. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7 (1): 21-26.

Miller J (1998). The metabolism of xenobiotics to reactive electrophiles in chemical carcinogenesis and mutagenesis: a collaboration with Elizabeth Cavert Miller and our associates. *Drug Metab Rev* 30:645–674.

Minamiyama Y, Takemura S, Imaoka S, Funae Y, Tanimoto Y, and Inoue M (1997). Irreversible inhibition of cytochrome P450 by nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 1479-1485.

Moldovan L and Moldovan NI (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem cell biology* 122: 395-412.

Montuschi P (2005). Exhaled breath condensate analysis in patients with COPD. *Clin Chim Acta.* 356(1-2):22-34.

Moon YJ, Wang X, Morris ME (2006). Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro.* 20(2):187-210.

Morel Y, Barouki R (1998). Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1. *J Biol Chem.* 273(41): 26969-26976.

Morel Y, Mermod N, Barouki R (1999). An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NFI. *Mol Cell Biol.* 19(10):6825-6832.

Mueller GC and Miller JA (1949). The reductive cleavage of 4-dimethylaminoazobenzene by rat liver: the intracellular distribution of the enzyme system and its requirement for triphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* 180: 1125–1136.

Mueller GC and Miller JA (1953). The metabolism of methylated aminoazo dyes. II. Oxidative demethylation by rat liver homogenates. *J Biol Chem* 202: 579–587.

Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F (2003). Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol.* 65(10):1575-82.

Nagata M (2005). Inflammatory cells and oxygen radicals. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 4(4): 503-4.

Nathan C (2002). Points control of inflammation. *Nature* 420 : 846-852.

Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, and Dalton TP (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59: 65–85.

Nebert DW and Russell DW (2002). Clinical importance of the cytochrome P 450. *Lancet* 360: 1155-1162.

Nemeth K, Furesz J, Csikor K, Schweitzer K, Lakatos S (2002). Luminol dependent chemiluminescence is related to the extracellularly released reactive oxygen intermediates in the case of rat neutrophils activated by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Haematologia.* 31: 277–285.

Nohl H, Gille L (2002). The bifunctional activity of ubiquinone in lysosomal membranes. *Biogerontology* 3:125–131.

Okayama Y (2005). Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 4(4):517-9

Omura T and Sato R (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 237:PC1375–PC1376

Oursler MJ, Bradley EW, Elfering SL, Giulivi C. (2005). Native, not nitrated, cytochrome c and mitochondria-derived hydrogen peroxide drive osteoclast apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288(1):C156-68.

Oyekan, AO (1995). The suppression by lipopolysaccharide of cytochrome P450-dependent renal vasodilation in the rat is mediated by nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 277 : 123– 132.

Pahan K, Sheikh FG, Khan M, Namboodiri AM, Singh I (1998). Sphingomyelinase and ceramide stimulate the expression of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes. *J Biol Chem.* 273(5):2591-2600.

Park J, Kim SH, Li Q, Chang YT, Kim TS (2006). Inhibition of interleukin-4 production in activated T cells via the downregulation of AP-1/NF-AT activation by N-lauroyl-D-erythro-sphingosine and N-lauroyl-D-erythro-C20-sphingosine. *Biochem Pharmacol.* 71(8):1229-1239.

Parkinson, A. (2001). Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen, C.D.(Ed.), Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, 6th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 133–224.

Parkinson A, Lasker J, Kramer MJ, Huang MT, Thomas PE, Ryan DE, Reik LM, Norman RL, Levin W, Conney AH (1982). Effects of three recombinant human leukocyte interferons on drug metabolism in mice. *Drug Metab Dispos.* 10(6):579-585.

Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM (2004). The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 199(3):193-209.

Pearson, GD, and Merrill GF (1998). Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *J Biol Chem* 273: 5431-5434.

Peterson TC and Renton KW (1984). Depression of cytochrome P 450 dependent drug biotransformation in hepatocytes after the activation of the reticuloendothelial system by dextran sulphate. *J Pharmacol Exp Ther* 229: 299-304.

Proulx M, du Souich P (1995). Inflammation-induced decrease in hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits is accompanied by an increase in hepatic oxidative stress. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 87(2):221-36.

Ramana KV, Kohli KK (1998). Gene regulation of cytochrome P450-An overview. *Indian J Exp Biol.* 36(5): 437-446

Rankin JA (2004). Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues* 15(1):3-17.

Rao GN, Glasgow WC, Eling TE, Runge MS (1996). Role of hydroperoxyeicosatetraenoic acids in oxidative stress-induced activating protein 1 (AP-1) activity. *J Biol Chem.* 271 (44) : 27760-27764.

Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Haussinger D (2005) Involvement of NADPH Oxidase Isoforms and Src Family Kinases in CD95-dependent Hepatocyte Apoptosis. *J Biol Chem.* 280: 27179 - 27194.

Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Haussinger D (2005). Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology.* 129(6):2009-2031.

Renton KW (1979). The deleterious effect of Bordetella pertussis vaccine and poly(rI.rC) on the metabolism and disposition of phenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 208(2):267-270.

Renton KW, Baker JC, et Bailey LE (1979). Cytochrome P-450 and hepatic drug biotransformation during progressive cardiac disease in cardiomyopathic hamsters. *Can J Physiol Pharmacol.* 57(3): 302-304.

Renton KW (2001). Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* 92(2-3): 147-163.

Rivory LP, Slaviero KA, Clarke SJ (2002). Hepatic cytochrome P450 3A drug metabolism is reduced in cancer patients who have an acute-phase response. *Br J Cancer* 87(3):277-280.

Roberts ES, Lin H, Crowley JR, Vuletich JL, Osawa Y, and Hollenberg PF (1998). Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine and inactivation of the catalytic activity of cytochrome P450 2B1. *Chem Res Toxicol* 11: 1067-1074.

Rodrigues AD, Lewis DF, Ioannides C, Parke DV. Spectral and kinetic studies of the interaction of imidazole anti-fungal agents with microsomal cytochromes P-450. *Xenobiotica.* 17(11):1315-1327.

Roveri, A, Coassin M, Maiorino M, Zamburlini A, van Amsterdam FT, Ratti E, and Ursini F. (1992). Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys* 297: 265-270.

Rush JW, Denniss SG, Graham DA (2005). Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. *Can J Appl Physiol* (4):442-474.

Ryan KJ and Engel LI (1957) Hydroxylation of steroids at carbon 21. *J Biol Chem* 225:103-114.

Samaras SC and Deitz N (1953). Physiopathology of detoxification of pentobarbital sodium. *Fed Am Soc Exp Biol* 12: 400.

Sanderson JT, Hordijk J, Denison MS, Springsteel MF, Nantz MH, van den Berg M (2004). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Sci.* 82(1):70-79.

Sanyal AJ (2005). Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2(1):46-53.

Schieven GL, Kirihara JM, Myers DE, Ledbetter JA, Uckun FM (1993). Reactive oxygen intermediates activate NF-kappa B in a tyrosine kinase-dependent mechanism and in combination with vanadate activate the p56lck and p59fyn tyrosine kinases in human lymphocytes. *Blood* 82 (4): 1212-1220.

Schreck, R., Rieber, P. and Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10: 2247-2258.

Schwab M, Klotz U (2001). Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease. *Clin Pharmacokinet.* 40(10):723-51

Sen, CK, Khanna S, Reznick AZ, Roy S, and Packer L (1997). Glutathione regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappa B activation in skeletal muscle-derived L6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 645-649.

Seo YK, Chung YT, Kim S, Echchgadda I, Song CS, Chatterjee B (2006). Xenobiotic- and vitamin D-responsive induction of the steroid/bile acid-sulfotransferase Sult2A1 in young and old mice: The role of a gene enhancer in the liver chromatin. *Gene*. Publication électronique.

Sergeeva SV, Slepneva IA, Khramtsov VV (2001). Effect of selenolipoic acid on peroxynitrite-dependent inactivation of NADPH-cytochrome P450 reductase. *Free Radic Res.* 35(5):491-497.

Shedlofsky SI., Israel BC, McClain CJ, Hill DB, & Blouin RA (1994). Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J Clin Invest* 94: 2209-2214.

Shedlofsky, S. I., Israel, B. C., Tosheva, R., & Blouin, R. A. (1997). Endotoxin depresses hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism in women. *Br J Clin Pharmacol* 43: 627- 632.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 414-423.

Sladek NE and Mannering GJ (1966). Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats. *Biochem Biophys Res Commun* 22: 668-674.

Slepneva IA, Sergeeva SV, Khramtsov VV (1995). Reversible inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase by alpha-lipoic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 214(3): 1246-1253.

Sonne J, Dossing M, Loft S, Andreassen PB (1985). Antipyrine clearance in pneumonia. *Clin Pharmacol Ther* 37: 701-704.

Stoscheck, CM (1990). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology.* 182: 50-69.

- Srinivasan V (2002). Melatonin oxidative stress and neurodegenerative diseases. *Indian J Exp Biol* 40(6): 668-79.
- Stirpe F & Della Corte E (1969). The regulation of rat liver xanthine oxidase – conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855–3863.
- Stromstedt M, Rozman D, Waterman MR (1996). The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 alpha-demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. *Arch Biochem Biophys*. 329(1): 73-81.
- Suzuki, YJ, and Ford GD (1991). Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum by reactive oxygen intermediates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 261: H568-H574.
- Suzuki, YJ, and Ford GD (1992). Superoxide stimulates  $\text{IP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 262: H114-H116.
- Takemura S, Minamiyama Y, Imaoka S, Funae Y, Hirohashi K, Inoue M, and Kinoshita H (1999). Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J Hepatol* 30: 1035-1044.
- Thannickal VJ and Fanburg BL (2000). Reactive oxygen species in cell signalling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: 1005-1028.
- Trenholme GM, Williams RL, Rieckmann KH, Frischer H, Carson PE (1976). Quinine disposition during malaria and during induced fever. *Clin Pharmacol Ther* 19(4):459-67.
- Trowbridge HO and Emling RC (1997). Inflammation: a review of the process. 5<sup>th</sup> edition. Chicago Quintessence Pub. Co.
- Turrens J (2003). mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(2): 335-343.
- Turrens JF, and Boveris A (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 191: 421–427.
- Valentine JS (2002). Do oxidatively modified proteins cause ALS? *Free Radic Biol Med.* 33(10): 1314-20.
- Vuppugalla R and Mehvar R (2004) Short term inhibitory effects of nitric oxide on cytochrome P450-mediated drug metabolism: time dependency and reversibility profiles in isolated perfused rat livers. *Drug metab dips.* 32(12):1446-1454.

Wang H and Joseph JA (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free rad biol med.* 27: 612-616.

Waxman DJ (1999). P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: Central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* 369: 11-23

Waxman DJ, Pampori NA, Ram PA, Agrawal AK, Shapiro BH (1991). Interpulse interval in circulating growth hormone patterns regulates sexually dimorphic expression of hepatic cytochrome P450. *Biochemistry* 88: 6868- 6872.

Wikvall K (2001). Cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of vitamin D to its hormonal form. *Int J Mol Med* 7(2): 201-209.

Wilhelm J, Vankoval M, Maxoval H, Siskova A (2003). Hydrogen Peroxide Production by Alveolar Macrophages Is Increased and Its Concentration Is Elevated in the Breath of Rats Exposed to Hypoxia: Relationship to Lung Lipid Peroxidation *Physiol. Res.* 52: 327-332.

Williams RT (1959). Detoxification mechanisms. Cunningham London

Williams SJ, Farrell GC (1986). Inhibition of antipyrine metabolism by interferon. *Br J Clin Pharmacol.* 22(5): 610-612.

Williams SJ, Baird-Lambert JA, Farrell GC (1987). Inhibition of theophylline metabolism by interferon. *Lancet* 2(8565): 939-941.

Winston GW, Moore MN, Kirchin MA, Soverchia C (1996). Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 113(2):221-229.

Wright K, Morgan ET (1990). Transcriptional and post-transcriptional suppression of P450IIC11 and P450IIC12 by inflammation. *FEBS Lett.* 271(1-2): 59-61.

Wu Y, Kwon KS and Rhee SG. (1998). Probing cellular protein targets of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with fluorescein-conjugated iodoacetamide and antibodies to fluorescein. *FEBS Lett* 440(1-2): 111-115.

Xu DX, Wei W, Sun MF, Wu CY, Wang JP, Wei LZ, Zhou CF (2004). Kupffer cells and reactive oxygen species partially mediate lipopolysaccharide-induced downregulation of nuclear receptor pregnane x receptor and its target gene CYP3a in mouse liver. *Free Radic Biol Med.* 37(1):10-22.

Yi F, Zhang AY, Janscha JL, Li PL, Zou AP (2004). Homocysteine activates NADH/NADPH oxidase through ceramide-stimulated Rac GTPase activity in rat mesangial cells. *Kidney Int.* 66(5):1977-1987.

Yildiz G, Demiryurek AT (1998). Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 39:179–184.

Yueh MF, Bonzo JA, Tukey RH (2005). The role of Ah receptor in induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *Methods Enzymol*. 400:75-91.

Zhang DX, Zou AP, Li PL (2003). Ceramide-induced activation of NADPH oxidase and endothelial dysfunction in small coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284(2):H605-12.

Zhou J, Struthers AD, Lyles GA (1999). Differential effects of some cell signalling inhibitors upon nitric oxide synthase expression and nuclear factor-kappaB activation induced by lipopolysaccharide in rat aortic smooth muscle cells. *Pharmacol Res*. 39(5):363-373.

Zhu H, Bannenberg GL, Moldeus P, Shertzer HG (1994). Oxidation pathways for the intracellular probe 20,70-dichlorofluorescein. *Arch Toxicol*. 68:582–587.

Zhukov A, Ingelman-Sundberg M (1999). Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells is abolished by inactivation of its electron donor NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochem J*. 340 (Pt 2): 453-458.

Zorov DB, Bannikova SY, Belousov VV, Vyssokikh MY, Zorova LD, Isaev NK, Krasnikov BF, Plotnikov EY.(2005). Reactive oxygen and nitrogen species: friends or foes? *Biochemistry (Mosc)*.70(2): 215-221.



