

2m 11. 2590. 2

Université de Montréal

Mesure de l'activité des cytochromes P450 dans deux modèles expérimentaux de
cirrhose

par

Marie-Claude Bastien

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

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

Novembre, 1997

© Marie-Claude Bastien, 1997



5.0P28 HMG

W

4

U58

1998

V.032



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Mesure de l'activité des cytochromes P450 dans deux modèles expérimentaux de
cirrhose

présenté par:

Marie-Claude Bastien

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Mémoire accepté le:

SOMMAIRE

Les cytochromes P450 (P450s) sont des enzymes de biotransformation responsables des réactions d'oxydation de plusieurs substances endogènes et exogènes. L'activité des cytochromes P450 est une des fonctions hépatiques majeures qui est diminuée dans la cirrhose. Plusieurs études ont démontré que l'activité des P450s ne diminue pas de façon uniforme dans la cirrhose et que le type de changement observé peut dépendre de l'étiologie de la maladie hépatique. Le but de cette étude était de déterminer si l'activité des cytochromes P450 était modifiée de façon différentielle dans deux types de cirrhose d'étiologie différente chez le rat. L'activité des cytochromes P450 a été évaluée *in vivo* par des tests d'exhalaison qui mesurent la vitesse de déméthylation d'un substrat par un cytochrome P450 en déterminant l'activité spécifique du $^{14}\text{CO}_2$ dans l'air expiré suite à l'administration d'un substrat marqué au ^{14}C sur des groupements méthyles.

En premier lieu, nous avons mis au point un test d'exhalaison à la nitrosodiméthylamine pour évaluer l'activité de l'isoenzyme CYP2E1. Le test d'exhalaison au nitrosodiméthylamine nous a permis de détecter l'induction de l'activité du CYP2E1 par le 4-méthylpyrazole et l'éthanol et son inhibition par le diallyl sulfide. Des inducteurs classiques d'autres P450s et reconnus pour ne pas affecter le CYP2E1 n'ont produit aucun effet sur les résultats des tests d'exhalaison à la nitrosodiméthylamine. Nous avons conclu que le test d'exhalaison à la nitrosodiméthylamine est une méthode de mesure efficace de l'activité enzymatique du CYP2E1 *in vivo* chez le rat.

Deux modèles expérimentaux de cirrhose ont été utilisés dans cette étude: une cirrhose biliaire secondaire induite par formolisation des voies biliaires et ligature du cholédoque, et une cirrhose micronodulaire induite par un traitement chronique au CCl_4 . Nos résultats indiquent que chez les rats avec une cirrhose biliaire, les résultats des tests d'exhalaison à la caféine (CYP1A2), à l'aminopyrine (CYP2C11) et à l'érythromycine (CYP3A2) sont diminués tandis que le résultat du test d'exhalaison à la nitrosodiméthylamine (CYP2E1) est inchangé. Chez les rats traités au CCl_4 , la variation dans les résultats des tests d'exhalaison était importante et aucun des résultats des tests d'exhalaison n'était significativement différent de chez les animaux témoins. Par contre, tout comme chez les rats avec cirrhose biliaires, les tests d'exhalaison à la caféine, à l'aminopyrine et à l'érythromycine étaient diminués chez les animaux avec une cirrhose plus sévère, tel qu'estimé par la diminution du poids du foie. Ces résultats suggèrent que l'activité enzymatique diminue avec la réduction du nombre d'hépatocytes fonctionnels dans le foie cirrhotique.

En conclusion la cirrhose expérimentale a causé une diminution de l'activité de certains P450s, alors que l'activité d'autres P450s est demeurée inchangée. Par ailleurs, les résultats suggèrent fortement que les mêmes P450s sont affectés indépendamment de l'étiologie de la maladie. Pour confirmer cette hypothèse, il faudra continuer ces études en élargissant le nombre de modèles expérimentaux de cirrhose étudiés. Des études futures devraient également être réalisées pour déterminer l'effet de la cirrhose sur le niveau des protéines des isoenzymes ainsi que sur les niveaux d'expression de leur ARN messager.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	IX
REMERCIEMENTS.....	X

CHAPITRE I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1- Les cytochromes P450.....	11
1.1 Structure et mécanisme d'action catalytique.....	12
1.2 Distribution générale et hépatique.....	13
1.3 Métabolisme des médicaments	13
1.4 Expression génique	14
2- Les maladies hépatiques et les cytochromes P450.....	15
2.1 Théories de l'hépatocyte intact et de l'hépatocyte malade.....	16
2.2 Effets des maladies hépatiques sur les enzymes microsomales.....	17
3- Modèles expérimentaux de maladies hépatiques.....	19
3.1 Cirrhose micronodulaire induite par le tétrachlorure de carbone.....	19
3.2 Cirrhose biliaire induite par ligature du cholédoque et formolisation des voies biliaires	20
4- Isoenzymes étudiées	
4.1 CYP1A2	24

4.2 CYP2C11.....	24
4.3 CYP2E1.....	24
4.4 CYP3A2	25
5- Les tests d'exhalaison	
5.1 Principes	25
5.2 Substrats utilisés	26
5.3 Test d'exhalaison existants	27
5.4 Test d'exhalaison à la nitrosodiméthylamine.....	29
5.5 Les tests d'exhalaison chez le rat.....	30
5.6 Le test d'exhalaison comme test quantitatif de la fonction hépatique..	32
6- Hypothèse et but	34
CHAPITRE II. Characterization of cytochrome P450 2E1 activity by the ¹⁴ C-nitrosodimethylamine breath test	35
1. Abstract	36
2. Résumé.....	37
3. Introduction	38
4. Materials and methods	40
5. Results	44
6. Discussion	47
7. References.....	51
8.Tables and Figures.....	59

CHAPITRE III. Differential alteration of cytochrome P450 activities in two experimental models of cirrhosis.....	65
1. Abstract	66
2. Résumé.....	67
3. Introduction	68
4. Materials and methods	70
5. Results	76
6. Discussion	78
7. References.....	83
8. Tables and Figures.....	89
CHAPITRE IV. DISCUSSION GÉNÉRALE	
1. Discussion	97
2. Conclusion	102
BIBLIOGRAPHIE	104
CURRICULUM VITAE	119

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cirrhose micronodulaire induite par le CCl ₄	22
Figure 2: Cirrhose biliaire induite par ligature du cholédoque et formolisation des voies biliaires	23
Figure 3: Appareil d'exhalaison.....	31

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ALT	alanine aminotransférase
ARN	acide ribonucléique
AST	aspartate aminotransférase
BDL	ligature du cholédoque
BNF	bêta-naphthoflavone
BSP	bromesulfophtaléine
CCL ₄	tétrachlorure de carbone
CCL ₃	trichlorure de carbone
CYP	cytochrome P450
HAP	hydrocarbures halogénés polycycliques
H&E	haematoxylin & eosin
ICG	vert d'indocyanine
LDH	lactate déhydrogenase
3MC	3-méthylcholantrène
MFO	oxydase à fonction mixte
NDMA	nitrosodiméthylamine
P450	cytochrome P450
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Jean-Pierre Villeneuve pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire. Son expérience en recherche et son support m'ont été d'une grande aide dans mon projet de recherche.

Cette recherche a été possible grâce à la collaboration de plusieurs personnes. Je remercie particulièrement Ginette Raymond pour son aide et ses conseils techniques durant mon stage de recherche. Je remercie les membres du Pavillon Saint-Luc du centre hospitalier de l'Université de Montréal pour leur accueil et pour avoir contribué à la création d'un environnement de travail agréable.

Merci également au Centre de recherche clinique André-Viallet pour l'aide financière accordée grâce à la Bourse André-Viallet.

CHAPITRE I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1-Les cytochromes P450 (P450s)

La biotransformation hépatique comporte deux grandes catégories de réactions: les réactions d'oxydation de phase I et les réactions de conjugaison de phase II. Les P450s sont des enzymes responsables des réactions d'oxydation de phase I de plusieurs substances endogènes (hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, acides biliaires, écosanoïdes, acides gras, vitamines liposolubles, bilirubine) et exogènes (xénobiotiques: substances exogènes ingérées pour des fins thérapeutiques ou récréationnelles) (Conney et al, 1986; Porter et Coon, 1991). Les P450s transforment des substances lipophiliques en métabolites plus polaires en introduisant ou en exposant des groupements fonctionnels (-OH, -COOH, -NH₂, -SH) afin de faciliter leur élimination (Gibson et Skett, 1994).

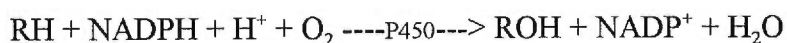
Le terme de cytochrome P450 a été originalement donné au système des monooxygénases pour décrire un pigment rouge qui, en présence de monoxyde de carbone, avait une absorption spectrale maximale à une longueur d'onde de 450 nm (Omura et Sato, 1964). Les animaux, les plantes et les microorganismes possèdent tous des P450s. Chez les mammifères, 242 isoenzymes du P450 ont déjà été purifiées, identifiées et classifiées (Nelson et al, 1996). Une nomenclature internationale basée sur le pourcentage d'homologie de la séquence des acides aminés a été développée pour décrire les gènes et les protéines du P450 (Nelson et al, 1993). Les protéines analogues sont regroupées selon leur structure, indépendamment de l'espèce d'origine. Les cytochromes P450 sont séparés en familles et sous-famille de gènes. Les gènes et les protéines correspondantes sont

appelés CYP. Les protéines d'une même famille ont un pourcentage d'homologie supérieur à 40% et les familles sont désignées par un chiffre arabe. Les membres d'une sous-famille possèdent plus de 55% d'homologie et les sous-familles sont représentées par des lettres alphabétiques. Finalement, les protéines individuelles de chaque sous-famille sont identifiées par des chiffres.

1.1-Structure et mécanisme d'action catalytique

Les P450s sont des hémoprotéines (Omura et Sato, 1964) généralement liées à la membrane plasmique. Elles sont composées de deux parties: (1) la moitié-hème, un groupement prosthétique identique d'une protéine à l'autre, est responsable de l'activité catalytique de l'enzyme, et (2) l'apoprotéine, dont la structure varie entre les isoformes, est responsable de la spécificité de substrat (Souček et Gut, 1992).

Malgré le fait qu'elles possèdent différentes sélectivités pour leurs substrats, les isoenzymes du P450 partagent le même mécanisme d'action catalytique d'hydroxylation dont la stochiométrie est la suivante (Powis et Jansson, 1979):



où RH représente le substrat et ROH est le métabolite hydroxylé. Puisque toutes les réactions entraînent l'insertion d'un atome d'oxygène dans la molécule biotransformée, les P450s sont aussi appelés des monooxygénases.

1.2-Distribution générale et hépatique

Les cytochromes P450 sont présents dans presque tous les tissus de l'organisme mais on les retrouve majoritairement au niveau du foie. Dans les hépatocytes, les P450s sont majoritairement localisés au niveau des membranes du réticulum endoplasmique (enzymes microsomales), mais ils sont aussi présents au niveau de l'enveloppe nucléaire, des mitochondries et des membranes cytoplasmiques (Ichikawa et Mason, 1973; Wu et Cederbaum, 1992).

Les cellules parenchymateuses du foie sont morphologiquement très homogènes, mais la distribution des enzymes n'est souvent pas uniforme dans le lobule hépatique. La concentration en P450 augmente progressivement à partir de l'espace porte vers la veine centrolobulaire (Lindros et al, 1997). Les facteurs qui contrôlent l'expression zonale des gènes du P450 sont peu connus. On pense que l'expression hétérogène des P450s serait le résultat d'un gradient sinusoïdal d'oxygène, d'hormones, de métabolites et autres facteurs humoraux (acides aminés, glucose, ammoniacque, acides gras) (Jungermann et Katz, 1982).

1.3-Métabolisme des médicaments

Avant d'être éliminés, la majorité des médicaments doivent être métabolisés par les P450s hépatiques. Dans la majorité des cas, les métabolites formés sont moins actifs que la substance mère, mais certains peuvent avoir une activité pharmacologique accrue et d'autres peuvent même être toxiques. Certains médicaments sont convertis en substances réactives capables de réagir de façon covalente avec des macromolécules, des protéines,

des acides nucléiques et des lipides biologiques et causer des dommages hépatiques (Parke et al, 1987). L'hépatotoxicité induite par le CCl_4 serait le résultat de l'activation de cette substance en plusieurs radicaux libres, dont le CCl_3 , qui se lieraient de façon covalente aux macromolécules du foie.

1.4-Expression génique

Il existe des différences qualitatives et quantitatives entre les espèces et des différences interindividuelles entre les membres d'une même espèce quant à l'expression de certains P450s. Chez le rat, la régulation de l'expression génique des formes constitutives de P450 n'est pas la même que pour les formes inductibles. L'expression des formes constitutives dépend entre autre de l'âge, du sexe et de la race de rat (Kato and Yamazoe, 1992; Quinn et al, 1958; Thomas et al, 1987; Waxman et al, 1985).

Les formes inductibles sont induites de façon spécifique par des xénobiotiques qui sont classifiés en plusieurs groupes selon les formes de P450s qu'ils induisent: les hydrocarbures halogénés polycycliques (HAP) (i.e. 3-méthylcholantène (3MC), bêta-naphthoflavone (BNF)), les barbituriques (i.e. phénobarbital), les stéroïdes (i.e. dexaméthasone), les hydrocarbures simples à chaîne aliphatique (i.e. éthanol, acétone), les antibiotiques macrolides (i.e. triacétyloléandomycine), et les médicaments hypolipémiants (i.e. clofibrate).

2-Les maladies hépatiques et les cytochromes P450

Chez les patients atteints de maladie hépatique chronique, la fonction hépatique diminue progressivement pendant une période de plusieurs années. Les signes cliniques de la cirrhose n'apparaissent que très tardivement, à un temps dans l'évolution de la maladie où le pronostic du patient est réservé (Saunders et al, 1981). Bien qu'il existe plusieurs méthodes cliniques pour évaluer la sévérité de l'atteinte hépatique chez l'homme, aucune de ces méthodes ne permet d'évaluer précisément la réserve fonctionnelle hépatique chez les patients cirrhotiques.

Puisque le foie joue de nombreux rôles physiologiques, il est difficile d'obtenir un aperçu global et compréhensif de toutes les fonctions hépatiques. Par contre, le métabolisme des substances endogènes et exogènes étant un des rôles majeurs du foie, l'évaluation de l'élimination de substances métabolisées par le cytochrome P450 est parfois utilisée comme mesure quantitative de la fonction hépatique.

En pratique, la fonction hépatique est souvent évaluée à partir de la clairance d'une seule sonde médicamenteuse. Le métabolisme oxydatif des sondes utilisées est généralement catalysé par des cytochromes P450 spécifiques. Par exemple, chez le rat, la déméthylation de l'aminopyrine est catalysée principalement par le CYP2C11 (Imaoka et al, 1988) tandis que le CYP1A2 est en grande partie responsable du métabolisme de la caféine (Fuhr et al, 1992; Tassaneeyakul et al, 1994). Toutefois, on ignore si l'activité de ces isoenzymes est représentative de l'ensemble de la fonction microsomale et si ces enzymes sont affectées de la même façon par diverses maladies hépatiques. En fait, il devient de plus en plus

évident que l'activité des P450s ne diminue pas de façon uniforme et que certaines isoenzymes sont plus sensibles que d'autres aux effets de la cirrhose. De nombreuses études évaluant les effets de la cirrhose sur le P450 ont été effectuées et démontrent que les isoenzymes du cytochrome P450 sont modifiées de façon différentielle en fonction de l'étiologie de la cirrhose (George et al, 1995; Murray et al, 1986, 1987). Ces résultats suggèrent que les tests de la fonction hépatique mesurant la clairance d'un médicament spécifique devront être adaptés au type de cirrhose évalué.

2.1-Hépatocyte intact versus hépatocyte malade

La cirrhose engendre plusieurs changements morphologiques et fonctionnels au niveau du foie résultant éventuellement en une diminution de l'élimination hépatique des médicaments chez les patients cirrhotiques. Dans les maladies hépatiques, plusieurs facteurs peuvent affecter le métabolisme des médicaments, les plus importants étant la composition enzymatique et le volume hépatocytaire du foie (Rowland et al, 1973). Dans la cirrhose, une partie du foie est remplacée par du tissu fibreux résultant en une diminution du nombre d'hépatocytes fonctionnels et du contenu en enzymes hépatiques. D'autres facteurs comme des changements au niveau du flux sanguin hépatique (anastomoses intra- et extra-hépatiques), l'hypoalbuminémie qui peut diminuer la fraction liée au plasma, et la capillarisation des sinusoides peuvent influencer le métabolisme des médicaments (Reichen et al, 1988).

Ils existent deux théories pour expliquer la diminution du métabolisme caractéristique aux maladies hépatiques. La théorie de l'hépatocyte malade suppose un flux sanguin normal

et la présence de cellules parenchymateuses dont le contenu des enzymes de biotransformation est réduit (Ohara et al, 1993), alors que la théorie de l'hépatocyte intact propose que les hépatocytes sont normaux, possédant une composition enzymatique normale, mais que le nombre des cellules hépatiques est diminué par la cirrhose et que le flux sanguin est anormal à cause de la présence d'anastomoses porto-systémiques qui permettent au sang de court-circuiter le foie (Reichen et al, 1987; Wood et al, 1979).

2.2-Effet des maladies hépatiques sur les enzymes microsomales

Farrell et al (1979) ont rapporté que les enzymes hépatiques de biotransformation ne sont pas toutes affectées également par les maladies du foie. En effet, chez des patients avec cirrhose ou avec hépatite sévère, ils ont observé que l'activité aryl hydrocarbure hydroxylase, mesurée dans des microsomes hépatiques, était diminuée mais que la déméthylation de l'éthylmorphine était inchangée.

L'importance de l'étiologie de la maladie hépatique sur l'expression et l'activité des P450s fut mise en évidence par George et al (1995). Ils ont étudié des patients avec des maladies hépatiques chroniques sévères, et ont comparé les maladies hépatiques avec ou sans cholestase. Le contenu hépatique en P450 total était diminué dans les deux cas, mais le contenu et l'activité catalytique de certains P450s hépatiques étaient modulés de façon différentielle. Par exemple, le CYP2E1 était réduit dans les maladies du foie avec cholestase mais pas dans d'autres types de cirrhose et le CYP3A était normal dans les maladies avec cholestase mais diminué dans les maladies non-cholestatiques.

Des résultats similaires ont été rapportés dans des études faites sur des modèles animaux de maladie du foie. Dans un modèle de cirrhose nutritionnelle induite chez le rat par une diète déficiente en choline, Murray et al (1986) ont démontré un changement différentiel dans l'activité catalytique d'enzymes hépatiques, mesurée *in vitro* dans des microsomes. Ils ont trouvé que la *O*-déethylation du 7-éthoxycoumarin (CYP1A1/2) était inchangée alors que la déméthylation de l'éthylmorphine (CYP2B, CYP3A) et l'aryl hydrocarbure hydroxylase (CYP1A1) était diminuée. Dans un modèle de cirrhose induite par l'inhalation répétée de CCl₄ chez le rat, Murray et al (1987) ont démontré une altération différentielle de l'activité enzymatique de plusieurs P450s en mesurant l'hydroxylation de l'androstènedione et de la testostérone dans des microsomes hépatiques. Chez les rats cirrhotiques, la 16 α -hydroxylation de l'androstènedione (CYP2C11) et l'hydroxylation aux positions 2 α -, 16 α - et 17 α - de la testostérone (CYP2C11) étaient diminuées mais l'hydroxylation aux positions 7 α - (CYP2A1) et 16 β - de l'androstènedione (CYP2B1) étaient inchangées, démontrant une fois de plus que les réactions d'oxydation des médicaments sont sélectivement diminuées dans la cirrhose.

Buters et al (1993) ont étudié le métabolisme de l'antipyrine *in vivo* en mesurant sa clairance et la formation de ses métabolites chez des rats avec une cirrhose induite par la ligature du cholédoque ou par l'administration de CCl₄. Ils rapportent que les P450s responsables des différentes voies de métabolisme de l'antipyrine étaient affectés différemment dans la cirrhose: la 3-hydroxylation de l'antipyrine était diminuée tandis que la 4-hydroxylation était inchangée. Toutefois, contrairement aux résultats obtenus chez

l'humain par George et al (1995), ils observent que les mêmes P450s sont affectés dans les deux modèles de cirrhose et suggèrent que chez le rat, l'étiologie de la maladie hépatique n'a pas d'effet majeur.

Finalement, Schaad et al (1995) ont comparé l'effet de divers types de lésions hépatiques (hépatectomie 1/3 et 2/3, anastomose porto-cave termino-latérale, ligature du cholédoque) sur la déméthylation de la caféine chez le rat. Leurs résultats suggèrent que le CYP1A2 pourrait être disproportionnellement diminué dans les maladies cholestatiques. L'ensemble de ces observations contribuent à nous faire penser qu'il serait important de savoir si différents P450s sont préférentiellement diminués dans diverses maladies du foie afin de déterminer, le cas échéant, quel sonde médicamenteuse serait la plus appropriée pour mesurer la fonction hépatique selon le type spécifique d'atteinte hépatique.

3-Modèles expérimentaux de maladies hépatiques

Pour vérifier l'hypothèse que les P450s sont modulés de façon différentielle dans diverses maladies du foie, il convient d'utiliser des modèles de cirrhose de différentes étiologies. Nous avons choisi un modèle de cirrhose biliaire induite par ligature du cholédoque et formolisation des voies biliaires, et un modèle de cirrhose micronodulaire induite par le CCl₄ chez des rats mâles Sprague Dawley.

3.1-Cirrhose induite par le tétrachlorure de carbone

La cirrhose induite par le CCl₄ est caractérisée par l'apparition de nodules hépatiques entourés de fibrose, une absence totale de micro-villosités aux bordures des hépatocytes,

l'apparition de dépôts de collagène dans l'espace de Disse, une défenestration des cellules endothéliales des sinusoides (capillarisation) et la présence d'anastomoses porto-systémiques .

Un traitement prolongé au CCl_4 induit le développement d'une cirrhose micronodulaire irréversible (Proctor et Chatamra, 1982; Wu et al, 1991) (Figure 1). Gascon-Barré et al (1989) ont démontré chez le rat que la cirrhose induite par le CCl_4 cause des lésions hépatiques semblables dans tous les lobes du foie mais que le degré de fibrose peut varier considérablement d'un animal à l'autre. La cirrhose induite par le CCl_4 ressemble beaucoup à la cirrhose alcoolique chez l'humain et l'hétérogénéité de ce modèle animal est similaire à celle observée chez l'homme (Bircher et al, 1987). La quantité de collagène présente dans le foie détermine en partie la masse d'hépatocytes fonctionnels du foie cirrhotique. Dans la cirrhose induite par le CCl_4 , le nombre d'hépatocytes est diminué en comparaison aux valeurs normales (Plourde et al, 1988) mais le contenu de chaque hépatocyte en P450 est comparable à celui des animaux témoins (Wu et al, 1991).

3.2-Cirrhose induite par une ligature du cholédoque et formolisation des voies biliaires

La cirrhose induite par une ligature du cholédoque est un modèle expérimental de cirrhose biliaire secondaire caractérisée par une prolifération des canaux biliaires, une augmentation du contenu en tissu conjonctif et une augmentation importante des taux d'acides biliaires dans le foie (cholestase) et dans le sang (Gross et al, 1987; Gall et al, 1990) (figure 2). La cirrhose induite par une ligature du cholédoque cause une augmentation du poids total du

foie due à l'augmentation de la proportion de cellules épithéliales biliaires. Par contre, le volume occupé par les hépatocytes reste comparable à celui d'un foie normal (Gall et al, 1990). Bien que le nombre d'hépatocytes soit maintenu, au point de vue enzymatique, la cirrhose biliaire est accompagnée d'une réduction significative de la fonction microsomale (Ohara et al, 1993).

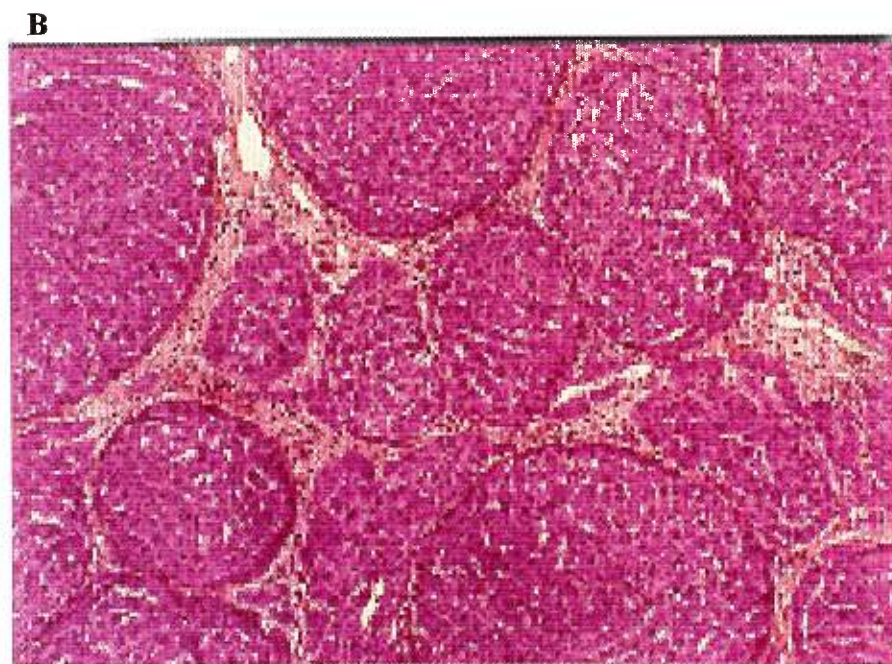
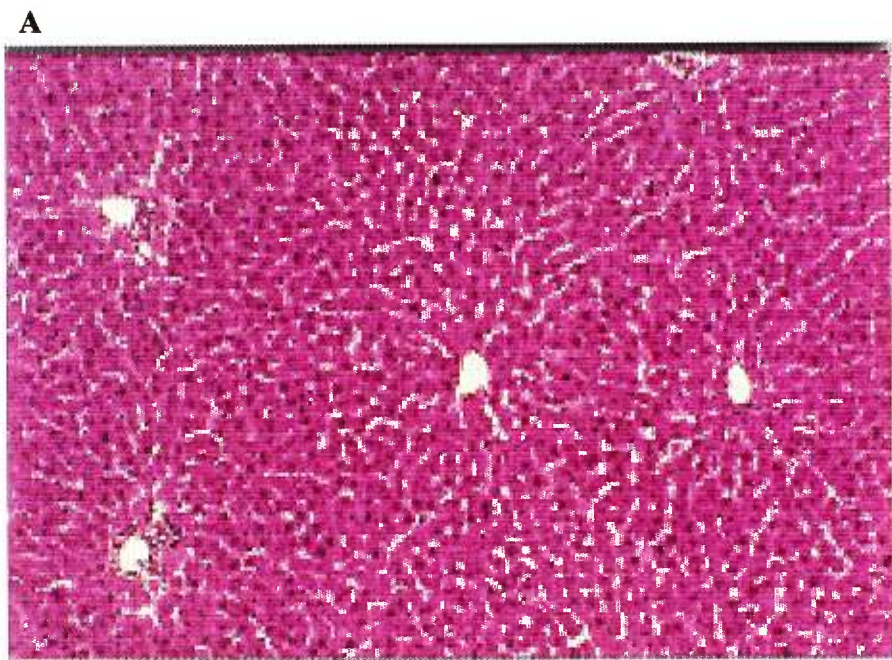


Figure 1. Sections histologiques de foie provenant de (A) un rat témoin et (B) un rat avec cirrhose micronodulaire induite par l'administration chronique de CCl₄.
H&E x 10.

A



B

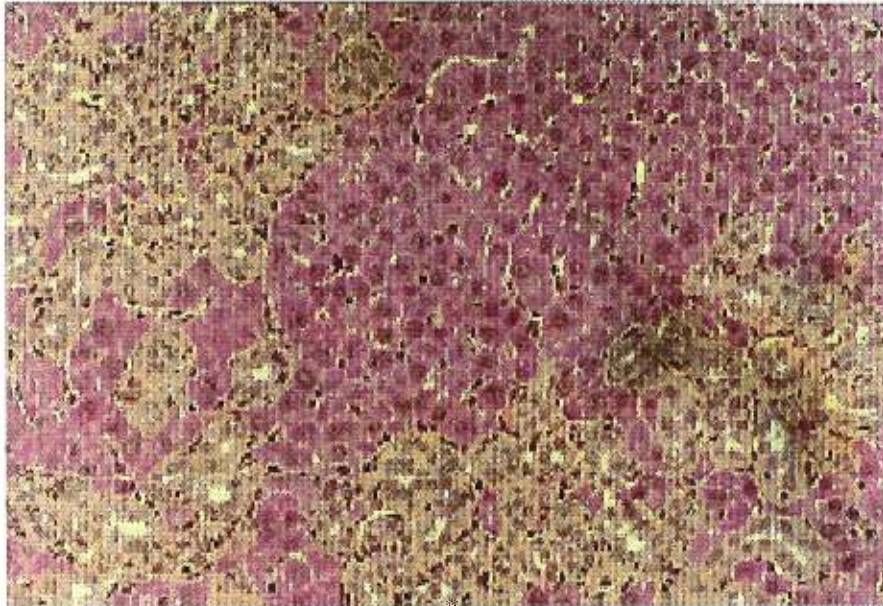


Figure 2. Sections histologiques de foie provenant d'un rat avec cirrhose induite par ligature du cholédoque et formolisation des voies biliaires. (1) H&E x10 (2) H&E x 25.

4-Isoenzymes étudiées

4.1-CYP1A2

Le CYP1A2 est retrouvé chez tous les mammifères et possède généralement la même activité enzymatique chez ces espèces (Gonzalez, 1989). Le gène du CYP1A2 est exprimé de façon constitutive au niveau du foie mais son expression n'est pas significative dans les tissus extra-hépatiques. CYP1A2 appartient à la famille d'enzymes inductibles dans le foie par les HAP (i.e. 3MC et 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD)) (Kimura et al, 1986). Le CYP1A2 est une des enzymes responsables de l'activation de certains cancérigènes (Parke et al, 1987). L'activité du CYP1A2 peut être mesurée *in vitro* et *in vivo* en mesurant les produits de la déméthylation de la caféine.

4.2-CYP2C11

L'expression du CYP2C11 est constitutive et spécifique aux mâles chez le rat (Matsumoto, 1986). C'est l'isoforme la plus abondante dans le foie chez le rat mâle non-induit (Waxman et al, 1985). Sa présence n'a pas été détectée dans les poumons, les reins et les testicules (Yoshioka et al, 1987). Chez le rat, le CYP2C11 est la forme prédominante impliquée dans le métabolisme de l'aminopyrine (Imakoa et al, 1988).

4.3-CYP2E1

Le CYP2E1 est exprimé de façon constitutive surtout au niveau du foie mais il est aussi exprimé et inductible dans les tissus extra-hépatiques (poumons et reins) (Song et al, 1987). L'enzyme est approximativement 80% similaire chez l'homme et le rat (Song et al, 1986). Le CYP2E1 catalyse le métabolisme oxydatif de plusieurs substances

organiques telles l'éthanol (Roberts et al, 1995) et les nitrosamines (Tu et Yang, 1985). Il est aussi impliqué dans le développement de certaines pathologies suite à l'activation de substances chimiques en métabolites toxiques et dans le mécanisme de peroxydation des lipides associé aux lésions hépatiques produites par l'alcool (Ekstöm et al, 1989; Morimoto et al, 1995).

4.4-CYP3A2

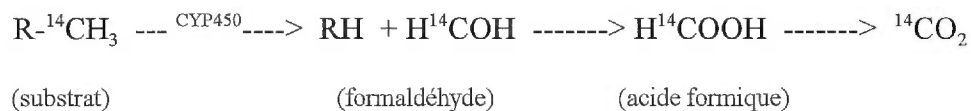
La famille 3A est une des plus grande sous-famille exprimée dans le foie humain (Wrighton et al, 1992). Chez le rat mâle, le CYP3A2 est exprimé constitutivement au niveau du foie et n'a pas été détecté dans les reins, les poumons et l'intestin (Debri et al, 1995). Les substrats de cette isoenzyme incluent: la cyclosporine A et l'érythromycine.

5-Les tests d'exhalaison

5.1-Principe

Puisque les lobules hépatiques sont considérés comme étant fonctionnellement identiques, la capacité hépatique fonctionnelle est équivalente à la masse hépatique. La clairance d'endo- ou xénobiotiques étant une des fonctions majeures du foie, l'évaluation de la fonction des hépatocytes peut être déterminée en terme de la clairance d'un médicament (Tygstrup et Vilstrup, 1983). La quantification de l'élimination de $^{14}\text{CO}_2$ après l'administration d'un substrat marqué au ^{14}C sur un groupement méthyle peut être utilisée comme méthode pour mesurer la fonction microsomale hépatique (Lauterberg et al, 1976; Roos et al, 1991).

Les réactions de déméthylation catalysées par les P450s sont des voies de métabolisme importantes pour plusieurs médicaments. Le formaldéhyde formée par la déméthylation est rapidement oxydée en CO₂ et excrétée dans l'air expiré.



Le taux de production de ¹⁴CO₂ correspond au taux de déméthylation du substrat et donc à l'activité enzymatique d'un ou de plusieurs P450s responsables de son métabolisme.

Les résultats des tests d'exhalaison reflètent non seulement des changements au niveau du métabolisme d'un médicament mais peuvent aussi être influencés par des changements au niveau du métabolisme du formaldéhyde. La précision du test d'exhalaison est basée sur la supposition que la déméthylation catalysée par les P450s est l'étape limitante dans la réaction représentée ci-haut. Dans notre protocole expérimental, nous avons exécuté un test d'exhalaison du formaldéhyde comme contrôle interne pour s'assurer que les conditions expérimentales ne causent aucun changement dans la cascade d'événements menant à la formation de ¹⁴CO₂ à partir du formaldéhyde et que les changements observés reflètent bien des changements dans le taux de déméthylation d'un substrat.

5.2-Substrats utilisés

La clairance d'un médicament peut être influencée par plusieurs facteurs dont la perfusion hépatique, la clairance intrinsèque, et la liaison aux protéines plasmatiques (Rowland et al,

1973). Les substrats pour les tests d'exhalaison sont choisis dans le but de mesurer la clairance intrinsèque hépatique et les médicaments utilisés doivent remplir certains critères. Le substrat doit être rapidement absorbé (s'il est donné par voie orale) et distribué de façon uniforme à travers l'organisme. La déméthylation doit être l'unique voie d'élimination et doit être l'étape limitante dans la production de $^{14}\text{CO}_2$. Idéalement, les substrats utilisés ne se lient pas ou peu aux protéines plasmatiques et ont un faible taux d'extraction hépatique pour que leur métabolisme ne soit pas affecté par des changements du débit hépatique.

5.3-Tests d'exhalaison existants

L'aminopyrine, la caféine et l'érythromycine sont quelques unes des substances utilisées *in vivo* chez le rat et chez l'humain pour évaluer l'activité enzymatique des P450s (Hepner et al, 1975; Kotake et al, 1982; Renner et al, 1984; Schaad et al, 1995; Watkins et al, 1989).

Parmi les tests d'exhalaison, le test d'exhalaison à l'aminopyrine (diméthylaminoantipyrine) est celui qui a été le plus couramment utilisé. La déméthylation est une voie de métabolisme majeure pour l'aminopyrine. Celle-ci subit deux déméthylations consécutives qui entraînent la formation d'un premier métabolite, le 4-monométhylaminoantipyrine suivi d'un second, le 4-aminoantipyrine (Imakoa et al, 1988). Kotake et al (1982) ont démontré une excellente corrélation entre les tests d'exhalaison à l'aminopyrine et la *N*-déméthylation de l'aminopyrine mesurée *in vitro*. Chez des patients cirrhotiques, Carlisle et al (1979) ont démontré une bonne corrélation entre les résultats des tests d'exhalaison

à l'aminopyrine et les biopsies de foie et ont conclu que celui-ci était un bon test clinique pour l'évaluation de la masse fonctionnelle hépatique des patients cirrhotiques.

Plusieurs cytochromes P450 peuvent déméthyliser l'aminopyrine (CYP1A1/2, 2B1/2, 2C11, 2C6, 2A2) mais Imaoka et al (1988) ont démontré que chez le rat, les P450s UT2 (CYP2C11) et PB-4 (CYP2B1) ont une haute affinité pour la *N*-déméthylation de l'aminopyrine. Dans notre modèle animal, le CYP2C11 est le cytochrome P450 le plus abondant chez les animaux non-induits par des xénobiotiques (Waxman et al, 1985). Pour cette raison, nous assumons que les résultats des tests d'exhalaison à l'aminopyrine reflètent l'activité du CYP2C11. En effet, les CYP2C11 et CYP3A2 constituent à eux seuls approximativement 50 % du contenu total en cytochrome P450 hépatiques chez les rats (Waxman et al, 1985). De ces deux cytochromes, l'ARN messager du CYP2C11 est le plus abondant lorsque quantifié par analyse de Northern chez les rats non-induits (Provencher et al, 1997).

Le test d'exhalaison à la caféine (1,3,7-triméthylxanthine) mesure l'activité du CYP1A2 hépatique. La caféine est une substance à faible taux d'extraction hépatique qui est lentement mais presque exclusivement métabolisée par le foie. La caféine génère quatre métabolites primaires, les réactions de déméthylation aux positions 1, 3 et 7 médiées par le CYP1A2 étant les voies de métabolisme les plus importantes (Berthou et al, 1992). Des études avec des microsomes hépatiques ont indiqué qu'approximativement 15% de la dose de caféine est métabolisée par la voie de biotransformation de déméthylation en position *N*-1 (Hayes, 1995), qui est la position à laquelle se situe le groupement méthyle marqué

au ^{14}C dans notre protocole expérimental.

La déméthylation est également la voie de métabolisme la plus importante pour l'érythromycine. Watkins et al (1989) ont déterminé que la vitesse de déméthylation de l'érythromycine mesuré via le taux de $^{14}\text{CO}_2$ dans l'air expiré correspondait à l'activité enzymatique de déméthylation de l'érythromycine mesurée *in vitro* et à la concentration de protéine immunoréactive du CYP3A2. Ils ont conclu que le test d'exhalaison à l'érythromycine était une bonne méthode pour évaluer le CYP3A2 chez le rat. Ce test est également utilisé chez l'homme pour mesurer l'activité du CYP3A4 (Watkins et al, 1989).

5.4-Le test d'exhalaison à la nitrosodiméthylamine

Plusieurs substances ont été utilisées pour évaluer l'activité catalytique du CYP2E1 *in vitro* dans des microsomes hépatiques. L'hydroxylation du p-nitrophénol (PNP) (Brady et al, 1991), du chlorzoxazone (Peter et al, 1990), et de l'aniline, et la déméthylation de la nitrosodiméthylamine (NDMA) (Ryan et al, 1986) sont toutes des activités enzymatiques catalysées par le CYP2E1. La NDMA est presque exclusivement métabolisé par le CYP2E1 au niveau du foie et une bonne corrélation a été démontrée entre le taux de CO_2 exhalé et la clairance de la NDMA dans le sang (Heath, 1962). A notre connaissance, aucune étude n'a déterminé la validité du test d'exhalaison utilisant la NDMA comme index de l'activité du CYP2E1 *in vivo* chez le rat.

5.5-Le test d'exhalaison chez le rat

Dans notre laboratoire, les tests d'exhalaison sont réalisés dans un appareil conçu à cet effet. Suite à l'administration d'un substrat marqué au ^{14}C , les rats sont immédiatement placés dans des cages de verre dans un système semi-fermé d'où le $^{14}\text{CO}_2$ dans l'air exhalé est collecté dans une solution qui emprisonne le dioxyde de carbone. Cette solution est changée tous les quinze minutes pendant une période de 2 à 3 heures. La quantité de ^{14}C dans chaque échantillon est déterminée par scintillation liquide, ce qui permet de mesurer le pourcentage de la dose de ^{14}C administrée récupérée dans l'air exhalé dans une période de temps déterminée. Le pourcentage cumulatif de la dose récupérée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ reflète le taux de déméthylation du substrat par l'isoenzyme responsable de son métabolisme.



Figure 3. L'appareil d'exhalaison est constitué par une cage de verre de laquelle l'air est aspiré a travers une série de tubes sous l'action d'un vacuum placé au bout du système. L'air exhalé par le rat passe premièrement a travers une colonne de drierite pour enlever l'humidité de l'haleine. Le $^{14}\text{CO}_2$ est collecté dans une solution qui absorbe le carbone de l'air.

5.6-Le test d'exhalaison comme test quantitatif de la fonction hépatique

La progression des maladies chroniques du foie est difficile à cerner. La fonction hépatique varie selon le type de maladie du foie, sa durée et sa sévérité. Tel que mentionné précédemment, lors de l'apparition des signes cliniques de décompensation, le pronostic des patients est peu encourageant. Le développement de tests quantitatifs de la fonction hépatique permettant d'évaluer la progression des maladies du foie pendant la phase asymptomatique comporterait plusieurs avantages. Ils permettraient de déterminer quels patients sont plus à risque de décompensation, l'efficacité des traitements, et la nécessité éventuelle d'une transplantation hépatique.

Les tests de fonction hépatique mesurent la capacité du foie à synthétiser, métaboliser, et/ou éliminer diverses substances (Tygstrup et Vilstrup, 1983; Zimmerman, 1983). Les différents tests utilisés incluent: la détermination des niveaux sanguin de substances relâchées par le foie endommagé (enzymes sériques: alanine aminotransférase (ALT), aspartate aminotransférase (AST)) (Murray et al, 1986; Winkel et al, 1970), la détermination de la capacité de synthèse de substances endogènes (facteurs de coagulation i.e. prothrombine, albumine, glycoprotéines) (Ritland et al, 1973; Winkel et al, 1970), la mesure de la clairance de substances endogènes (bilirubine, acides biliaires) (Milstein et al, 1976; Ekindjian et al, 1981), l'excrétion de colorants anioniques (bromesulfophtaléine (BSP), vert d'indocyanine (ICG)) (Tygstrup et al, 1964), et l'évaluation de changements au niveau du métabolisme des médicaments (Andreasen et al, 1974).

A ce jour, il n'y a pas de test de laboratoire analogue à la détermination du taux de filtration glomérulaire utilisé par les néphrologues, pouvant mesurer précisément la réserve fonctionnelle hépatique. Plusieurs tentatives ont été faites pour démontrer une corrélation entre les transaminases (AST, ALT), le temps de prothrombine ou la concentration de bilirubine et la fonction hépatique, mais la plupart des études ont montré que des changements au niveau de ces paramètres ne reflètent pas bien la réserve hépatique (Branch et al, 1973; Carlisle et al, 1979).

Présentement, une des méthodes les plus utilisés en clinique pour déterminer le pronostic à court terme d'un patient cirrhotique est l'index pronostique Child-Pugh (Child and Turcotte, 1964; Pugh et al, 1973). Ce test évalue la sévérité de la maladie hépatique d'après une combinaison de paramètres cliniques et biochimiques. Malheureusement, la précision et l'utilité de ce test est beaucoup moindre chez les patients avec une cirrhose compensée que chez ceux où la cirrhose est décompensée.

Une alternative suggérée pour évaluer la fonction hépatique chez les patients cirrhotiques serait d'utiliser des tests hépatiques quantitatifs, comme les tests d'exhalaison, de façon longitudinale dans le temps pour évaluer les changements de la capacité métabolique du foie (Gross et al, 1987; Hepner et Vessel, 1975; Schneider et al, 1985). Cependant, bien qu'ils permettent de prédire la mortalité à 1 ou 2 ans avec un certain degré de précision chez des patients cirrhotiques, il n'a pas été démontré de façon concluante que l'utilisation des tests d'exhalaison soit plus avantageuse que les tests conventionnels de fonction hépatique. Par exemple, Villeneuve et al (1986) ont démontré que le test d'exhalaison à

l'aminopyrine ne donnait aucune information pronostique additionnelle à celle obtenue par l'index de Child-Pugh.

La plupart des études ayant évalué les tests d'exhalaison comme tests quantitatifs de la fonction hépatique chez l'homme comportent certaines lacunes. Un des problèmes communs à ces études est l'utilisation d'une population hétérogène de patients avec des cirrhoses de différentes étiologies. En plus, on ignore si l'activité des isoenzymes mesurée via le métabolisme des sondes médicamenteuses utilisées dans les tests d'exhalaison reflète bien l'ensemble de la fonction microsomale hépatique.

6-Hypothèse et but

La première étape de cette étude était de déterminer si le NDMA est un substrat adéquat chez le rat pour l'évaluation de l'activité catalytique du CYP2E1 *in vivo* par un test d'exhalaison.

Dans une seconde étape, nous avons évalué l'hypothèse voulant que l'activité d'un ou plusieurs enzymes soit diminuée de façon préférentielle dans différents types de cirrhose. Le but de notre étude était de déterminer l'effet de deux modèles expérimentaux de cirrhose sur l'activité des CYP1A2, CYP2C11, CYP2E1, et CYP3A2 mesurée par des tests d'exhalaison chez le rat.

Chapitre II.

**CHARACTERIZATION OF CYTOCHROME P450 2E1 ACTIVITY BY THE
¹⁴C-NITROSODIMETHYLAMINE BREATH TEST ¹**

Marie-Claude Bastien and Jean-Pierre Villeneuve

Centre de recherche, Pavillon Saint-Luc, Centre hospitalier de l'Université de Montréal

and

Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Montréal,

Montréal, Canada.

¹ Cet article a été soumis à la revue Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.

Abstract

The objective of this study was to measure the rate of demethylation of nitrosodimethylamine *in vivo* in the rat and determine its value to assess CYP2E1 activity in intact animals. Nitrosodimethylamine labeled with ^{14}C on both methyl groups was administered to rats and exhaled $^{14}\text{CO}_2$ was collected during 2-3 hours. The nitrosodimethylamine breath test was increased by inducers of CYP2E1 such as ethanol (+139%), and 4-methylpyrazole (+115%) and decreased by the inhibitor diallyl sulfide (-53%). In addition, the nitrosodimethylamine breath test was not changed significantly by inducers specific for other cytochromes P450 such as beta-naphthoflavone, dexamethasone and phenobarbital. The specificity of the induction by 4-methylpyrazole and of the inhibition by diallyl sulfide for CYP2E1 was determined using the ^{14}C -caffeine (CYP1A2), ^{14}C -aminopyrine (CYP2C11) and ^{14}C -erythromycin (CYP3A2) breath tests. 4-methylpyrazole treatment caused a small increase of the caffeine (+33%) and aminopyrine (+9%) breath tests and no change of the erythromycin breath test. Diallyl sulfide treatment led to a small decrease of the caffeine breath test (-33%) and of the aminopyrine breath test (-13%), but a 23% increase of the erythromycin breath test. It is concluded that the ^{14}C -nitrosodimethylamine breath test is useful to assess CYP2E1 activity *in vivo* in the rat.

Key words: Breath test, CYP2E1, nitrosodimethylamine

Résumé

Le but de cette étude était de déterminer la valeur du test d'exhalaison au nitrosodiméthylamine pour évaluer l'activité du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) *in vivo* chez le rat. Le nitrosodiméthylamine marqué au ^{14}C sur deux groupements méthyles a été administré aux rats et le $^{14}\text{CO}_2$ exhalé a été collecté pendant 2 à 3 heures. La quantité de $^{14}\text{CO}_2$ exhalé a été augmentée par des inducteurs du CYP2E1 comme l'éthanol (+139%), et le 4-méthylpyrazole (+115%) et diminuée par l'inhibiteur diallyl sulfide (-53%). Des inducteurs spécifiques à d'autres cytochromes P450 comme le bêta-naphthoflavone, la dexaméthasone, et le phénobarbital n'ont causé aucun changement significatif au test d'exhalaison à la nitrosodiméthylamine. La spécificité de l'induction par le 4-méthylpyrazole et de l'inhibition par le diallyl sulfide pour le CYP2E1 a été déterminée en utilisant des tests d'exhalaison à la caféine (CYP1A2), à l'aminopyrine (CYP2C11), et à l'érythromycine (CYP3A2). Le 4-méthylpyrazole a causé une induction des test d'exhalaison à la caféine (+33%) et à l'aminopyrine (+9%). Le diallyl sulfide a produit une inhibition des tests d'exhalaison à la caféine (-33%) et à l'aminopyrine (-13%), et une augmentation du test d'exhalaison à l'érythromycine (+23%). Les résultats obtenus indiquent que le test d'exhalaison au nitrosodiméthylamine est utile pour mesurer l'activité du CYP2E1 *in vivo* chez le rat.

Mots clés: Test d'exhalaison, CYP2E1, nitrosodiméthylamine

Introduction

The cytochromes P450 (P450s) are a group of hemoproteins which catalyse the oxidative metabolism of a number of endogenous and exogenous compounds, transforming them into substances that are more readily eliminated from the body. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) is the primary isoenzyme involved in the metabolism of a range of small organic compounds including acetone (Chen et al. 1994), ethanol (Yang et al. 1990), and nitrosamines (Tu and Yang 1985). CYP2E1 is constitutively expressed and can be induced or inhibited by various chemicals. CYP2E1 is inducible by agents such as ethanol (Roberts et al. 1995), isoniazid (Park et al. 1993) and 4-methylpyrazole (Palakodety et al. 1988; Thomas et al. 1987). Inhibitors of CYP2E1 include diallyl sulfide (Brady et al. 1991b) and phenethyl isothiocyanate (Ishiazaki et al. 1990; Morimoto et al. 1995). CYP2E1 has been implicated in pathological processes such as carcinogenesis (Tsutsumi et al. 1993) and the activation of some substrates into toxic metabolites. Nitrosodimethylamine (NDMA) is one substrate for which metabolism by CYP2E1 leads to the production of a mutagenic DNA alkylating reactive metabolite (Jorquera et al. 1994). CYP2E1 can also generate reactive intermediates such as superoxide radicals that can initiate lipid peroxidation, a process which has been associated with liver damage in alcoholic liver disease (Ekstöm et al. 1989; Morimoto et al. 1993).

Breath tests have been developed as non-invasive and efficient methods of evaluating the catalytic activity of cytochrome P450 isoenzymes *in vivo*. Formaldehyde is the immediate product of P450-catalysed demethylation reactions. The formaldehyde generated by

demethylation is rapidly converted to formate and approximately one-half of the carbon atoms derived from formaldehyde appear in the breath as carbon dioxide. The rate of production and subsequent exhalation of $^{14}\text{CO}_2$ from a suitable radiolabeled substrate reflects the *in vivo* rate of its demethylation and thus the catalytic activity of either a subset or a specific cytochrome P450. Various substrates have been used to evaluate the activity of specific or multiple P450s *in vivo* in both rats and humans. Aminopyrine is metabolised by several P450s (Imaoka et al. 1988) and the aminopyrine breath test has often been used to evaluate liver function (Lauterburg and Bircher 1976; Perri et al. 1994 ; Villeneuve et al. 1983). The erythromycin breath test has been developed to assess CYP3A activity (Watkins et al. 1989). The caffeine breath test has been used to measure CYP1A2 activity as well as liver function in the rat (Renner et al. 1984; Schaad et al. 1995). CYP2E1 is the major isoenzyme involved in the metabolism of NDMA and is responsible for both the demethylation and denitrosation pathways (Kroeger-Koepke et al. 1981; Yoo et al. 1990). NDMA demethylase activity is commonly used to estimate CYP2E1 activity in reconstituted microsomal systems *in vitro*. It seemed reasonable to think that NDMA could be an adequate substrate for a breath test since N-demethylation is one of the major metabolic pathways of elimination of this substrate. The objective of this study was to determine the suitability of the NDMA breath test for the evaluation of CYP2E1 activity *in vivo* in rats.

Methods and materials

Material

[Dimethyl-¹⁴C]-Aminopyrine (99 mCi/mmol), [1-Methyl-¹⁴C]-Caffeine (53.3 mCi/mmol), N-[Dimethyl-¹⁴C]- Erythromycin (55 mCi/mmol), [¹⁴C]- Formaldehyde (10 mCi/mmol), and N-[Dimethyl-¹⁴C]-Nitrosodimethylamine (57.6 mCi/mmol) were purchased from Dupont-New England Nuclear (Boston, MA). Diallyl sulfide, beta-naphtoflavone, dexamethasone, and 4-methylpyrazole were purchased from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). The liquid ethanol and control diets were obtained from Bio-Serv (Frenchtown, NJ). All other reagents were of the highest purity commercially available.

Animals

Male Sprague-Dawley rats (Charles Rivers Canada Ltd., St-Constant, Qué.) weighing between 200 and 300g were used for all experiments. Animals were housed two to four per cage on a 12 hour light-dark cycle with free access to normal rat chow diet (Purina rat chow) and water. All animal work was approved by our institution's animal protection committee. Animals were taken care of in accordance to the guidelines set by the Canadian Council on Animal Care.

N-[Dimethyl-¹⁴C]-Nitrosodimethylamine breath test

Breath tests were performed in rats fed *ad libitum* except in the experiment comparing different routes of administration for ¹⁴C-NDMA, where the animals were fasted over night prior to performing the breath test. Under isoflurane anaesthesia, each rat received

0.25 μCi of radiocative NDMA administered intravenously (i.v.) in the penial vein, intraperitoneally (i.p.) or by gastric gavage (i.g.) with amounts of unlabeled NDMA varying between 0-35mg/kg body weight. Rats were then immediately placed in glass breathing chambers that allowed for the collection of exhaled ^{14}C -labeled carbon dioxide. The breath test apparatus used was similar to that previously described by Villeneuve et al (1978). The air exhaled was directed through a system of tubes attached to the restraining chamber by the action of vacuum pressure. The air was passed through a dehumidifying column of Drierite to remove water vapour and was then bubbled through a solution of 10 ml methanol-ethanolamine 2:1 (v/v) which trapped $^{14}\text{CO}_2$ exhaled by the rat. Collections of exhaled $^{14}\text{CO}_2$ were performed at 15 min intervals for 2-3 hours, in glass scintillation vials containing the trapping solution. Ten ml of scintillation fluid (Hionic-fluor) was added to each vial and the content of ^{14}C was determined using a β counter (Beckman LS1801). The amount of $^{14}\text{CO}_2$ recovered in breath was expressed as a percentage of the dose of radiolabel administered plotted as a function of time (per 15 min interval). Two parameters frequently used in assessing $^{14}\text{CO}_2$ breath tests were determined: (1) the peak exhalation rate (P_{max}), i.e. the highest value of the $\%^{14}\text{CO}_2$ recovered/15 min period, and (2) the cumulative $^{14}\text{CO}_2$ output over 2 or 3 hours (Bhatt et al.1985; Hickey et al. 1995; Schaad et al. 1995; Watkins et al. 1989); since both of these values gave comparable results in general, only the cumulative $^{14}\text{CO}_2$ recovery will be reported unless a difference in the two values was found.

In the rats who received a range of doses of unlabeled NDMA, blood was obtained for serum aminotransferase (ALT, AST) measurement and liver samples were obtained for

histology, 24 hours after NDMA administration.

Other [¹⁴C]-breath tests

In the caffeine, erythromycin and formaldehyde breath tests, rats received 0.25 μ Ci of a tracer dose of the ¹⁴C-labeled substrates intravenously. For the aminopyrine breath test, animals received 50 mg/kg of unlabeled drug with the tracer dose (0.25 μ Ci).

Treatments

For the chronic ethanol treatment, 16 littermate rats were separated into 2 groups of 8 rats and were housed in individual wire-bottom cages. The first group was fed a liquid diet in which ethanol provided 35% of the total caloric intake (Bio-Serv LD'82) for 21 days. For the second group, pair-fed littermate controls consumed the same diet except that carbohydrate isocalorically replaced the ethanol. Food was taken away from the animals 6 hours prior to the NDMA breath test. Other substrates used to induce CYP2E1 included: isoniazid (250 mg/kg body weight, 125 mg/ml in saline) and 4-methylpyrazole (50 mg/kg body weight, 20 mg/ml in saline) i.p. daily for 3 consecutive days. Breath tests were performed before and 24 hours following the last dose of inducer. ¹⁴C-NDMA breath tests were also performed in rats who received inducers of other CYP450 isoenzymes in order to determine their effect on NDMA metabolism: beta-naphthoflavone (80 mg/kg body weight, 10 mg/ml in corn oil), dexamethasone (10 mg/kg body weight, 10 mg/ml in corn oil), and phenobarbital (80 mg/kg body weight, 80 mg/ml in saline) i.p. daily for 3 consecutive days. For inhibition studies, a single dose of diallyl sulfide (200 mg/kg body weight, 50 mg/ml in corn oil) was administered i.g. 5 hours before rats were

subjected to ^{14}C -NDMA breath tests. The specificity of the inducers and inhibitor for CYP2E1 was assessed by performing breath tests using various radiolabeled probes in order to evaluate their effects on the catalytic activity of other P450 isoenzymes: ^{14}C -aminopyrine (CYP2C11), ^{14}C -caffeine (CYP1A2) and ^{14}C -erythromycin (CYP3A2). Breath tests using ^{14}C -formaldehyde were performed to insure that the different experimental conditions did not affect formaldehyde metabolism.

Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm standard error (SEM). Differences between groups were determined using a student's t-test. Differences between multiple groups were determined using a one-way ANOVA with the Bonferroni multiple comparisons test. A probability of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Effect of route of administration

A group of 6 rats was administered 0.25 μ Ci of 14 C-NDMA via three different routes (i.v., i.p., and i.g.). Fig. 1A shows the percentage of 14 CO₂ recovered per 15 min period for three hours for the three routes of administration. There was no significant difference in the cumulative percentage of the dose recovered after intravenous and intraperitoneal administration, but the percentage of 14 CO₂ recovered after an oral dose was lower than after intravenous administration (-18%, $p < 0.05$) (Fig. 1B). In all subsequent experiments, the intravenous route of administration was used.

Demethylation rate versus dose

The effect of varying doses of unlabeled NDMA (0-35 mg/kg body weight) administered with the tracer dose of 14 C-NDMA on the recovery of 14 CO₂ in breath is shown in Figure 2. A dose of 10 mg/kg decreased the percentage of 14 CO₂ exhaled to about half of the value obtained with the tracer dose only. At doses of 5 and 10 mg/kg, aminotransferases concentrations remained normal whereas higher doses caused a rise in AST and ALT (Table 1). Histological examination of the livers showed mild centrilobular necrosis only with the 20 mg/kg dose. All subsequent 14 C-NDMA breath tests were performed using a dose of unlabeled NDMA of 10 mg/kg body weight along with the 14 C-tracer dose.

Effect of enzyme induction

Rats were subjected to treatment with 3 inducers of the CYP2E1: ethanol, isoniazid and 4-methylpyrazole (Fig. 3A). The NDMA breath test in rats receiving ethanol was increased to 239% of control (control: 13.6 ± 1.2 , ethanol: 32.4 ± 3.0 , $p < 0.05$). In rats treated with 4-methylpyrazole, the NDMA breath test increased to 215% of the basal value after 3 days of induction (basal: 17.8 ± 1.7 , 4-methylpyrazole: 38.3 ± 4.3 , $p < 0.05$). Following isoniazid treatment, the % $^{14}\text{CO}_2$ output did not increase significantly (basal: 23.1 ± 1.8 , isoniazid: 27.8 ± 2.0 , n.s.). The only parameter that changed as a result of isoniazid was the time it took to reach the peak exhalation rate (basal: 115 ± 3.2 min, isoniazid: 80 ± 5.0 min, $p < 0.05$). The effect of inducers of other cytochromes P450 was evaluated to confirm the specificity of the NDMA breath test for the CYP2E1 activity (Fig. 3B). Betanaphthoflavone (80 mg/kg), dexamethasone (10 mg/kg) and phenobarbital (80 mg/kg) treatment did not affect the cumulative $^{14}\text{CO}_2$ output.

Effect of diallyl sulfide

Treatment with diallyl sulfide caused a 53% decrease in CYP2E1 activity (basal: 13.1 ± 0.7 , diallyl sulfide: 6.2 ± 0.3 , $p < 0.05$). Formaldehyde metabolism was unaffected by diallyl sulfide treatment (basal: 37.2 ± 1.0 , diallyl sulfide: 36.2 ± 0.9 , n.s.) (Fig. 4). The specificity of the inhibition by diallyl sulfide for the CYP2E1 was evaluated by measuring the activity of the cytochromes P450 CYP1A2, CYP2C11, and CYP3A2 via the ^{14}C -caffeine, ^{14}C -aminopyrine, and ^{14}C -erythromycin breath tests. Diallyl sulfide treatment caused a 33% reduction in the caffeine breath test (basal: 9.0 ± 0.4 , diallyl sulfide: 6.0 ± 0.2 , $p < 0.05$) and a 13% reduction in the aminopyrine breath test (basal: 25.3 ± 1.0 , diallyl sulfide: 22.1 ± 2.0 ,

$p < 0.05$). In contrast, the erythromycin breath test was increased by 23% (basal: 7.8 ± 0.3 , diallyl sulfide: 9.6 ± 0.5 , $p < 0.05$) (Fig. 4).

Effect of 4-methylpyrazole on other P450s

Treatment with 4-methylpyrazole (50 mg/kg i.p. x 3 days) did not affect the $^{14}\text{CO}_2$ output following the administration of ^{14}C -labeled erythromycin (basal: 10.6 ± 0.2 , 4-methylpyrazole: 11.1 ± 0.5 , n.s.) and formaldehyde (basal: 39.5 ± 1.5 , 4-methylpyrazole: 36.7 ± 2.6 , n.s.). However, 4-methylpyrazole caused a 33% increase of the caffeine breath test (basal: 9.4 ± 0.5 , 4-methylpyrazole: 12.5 ± 0.4 , $p < 0.05$) and a small but significant 9% increase in aminopyrine demethylation (basal: 26.8 ± 1.8 , 4-methylpyrazole: 29.2 ± 2.2 , $p < 0.05$) (Fig. 5).

Discussion

NDMA demethylation is one of the microsomal reactions used to evaluate CYP2E1 activity *in vitro*. In 1962, Heath reported that the rate of $^{14}\text{CO}_2$ exhaled in breath was related to the rate of NDMA disappearance from blood *in vivo*. The present study demonstrates that the demethylation of ^{14}C -labeled NDMA measured by a breath test can be used to evaluate CYP2E1 activity *in vivo* in rats.

The cumulative percentage of $^{14}\text{CO}_2$ recovered following the administration of a tracer dose of NDMA was significantly lower after i.g. than i.v. dosing which suggests that the absorption was slow or incomplete. These findings are in agreement with previous pharmacokinetic data which demonstrated that NDMA is absorbed slowly following oral dosing compared to i.p. administration and that bioavailability is incomplete (Peggs and Perry, 1981). At very low doses, NDMA has a high extraction ratio (approximately 92%) (Mico et al. 1985). Thus the rate of elimination of tracer doses of NDMA after intravenous administration is determined by hepatic blood flow rather than enzymatic activity. Hepatic extraction of NDMA decreases with increasing doses, and clearance progressively becomes enzyme limited (Skipper et al. 1983). At doses of 10 mg/kg or higher, NDMA clearance displays zero order kinetics, and the amount of $^{14}\text{CO}_2$ exhaled following the administration of ^{14}C -labeled NDMA correlates well with its rate of metabolism (Heath 1962; Skipper et al. 1983). In the present study, a dose of 10 mg/kg of unlabeled NDMA was used with the ^{14}C -tracer, providing conditions where the rate of demethylation of NDMA is enzyme-limited and reflects the activity of CYP2E1 rather than

being dependent on hepatic blood flow.

Previous studies have demonstrated a good correlation between levels of aminotransferases and hepatic necrosis induced by NDMA at doses >10 mg/kg in the rat (Krosrud et al. 1973). In this study, aminotransferase levels increased 24 hours after NDMA doses of 15 mg/kg or more.

Ethanol and 4-methylpyrazole both caused the expected increase in NDMA metabolism. However, the CYP2E1 inducer isoniazid increased neither the $^{14}\text{CO}_2$ output nor the peak exhalation rate. This is in contrast with results obtained by Park et al. (1993) where three consecutive daily doses of isoniazid increased both the amount of CYP2E1 immunoreactive protein and the microsomal catalytic activity for aniline hydroxylase. Diallyl sulfide administration caused an important decrease of $^{14}\text{CO}_2$ output following NDMA administration, consistent with the effect of diallyl sulfide on CYP2E1 dependent drug metabolism by microsomes (Brady et al. 1991a; Kwak et al. 1994). Monostory et al. (1994) determined that neither phenobarbital nor dexamethasone pretreatment caused an increase in CYP2E1-mediated parnitrophenol-hydroxylation *in vitro*. In another study, Matsuda et al. (1995) showed that in male F344 rats, beta-naphthoflavone treatment (50 mg/kg i.p. x 3 days) did not increase CYP2E1 content in the liver. Similarly, in the present study, neither beta-naphthoflavone, dexamethasone nor phenobarbital caused a significant increase in the NDMA breath test indicating that it reflects CYP2E1 activity specifically.

To determine the specificity of the induction by 4-methylpyrazole and of the inhibition by diallyl sulfide for CYP2E1, their effect on substrates for which the demethylation is mediated by other P450s was examined. The caffeine breath test was inducible by 4-methylpyrazole but to a much smaller degree than the NDMA breath test. Similar results were obtained by Hayes et al. (1988) where treatment of adult male Wistar rats with 4-methylpyrazole caused an increase in both p-nitrophenol hydroxylase (CYP2E1) and ethoxyresorufin deethylase (CYP1A2) activity *in vitro* but had no significant effect on benzphetamine N-demethylase activity (CYP2B1/2). Interestingly, in a study on caffeine metabolism by human hepatic microsomes, Tassaneeyakul et al. (1994) demonstrated the implication of CYP2E1 as a low affinity component of the N1-demethylation pathway of caffeine *in vitro*. It is possible that the increased rate of caffeine metabolism following 4-methylpyrazole administration is not due to the induction of CYP1A2 but to the increased contribution of the induced CYP2E1 to the metabolism of caffeine. This could also explain the inhibition of the caffeine breath test by diallyl sulfide. 4-Methylpyrazole caused a small increase in the aminopyrine breath test. Diallyl sulfide treatment decreased both the caffeine (CYP1A2) and aminopyrine (CYP2C11) breath tests. In contrast to our findings, Dragnev et al. (1995) found a limited induction of CYP1A2 (methoxyresorufin *O*-dealkylation *in vitro* and mRNA quantification) following diallyl sulfide treatment (200 or 500 mg/kg i.g./dy x 3 days).

Although useful in the rat, NDMA cannot be used in man because of its toxicity and carcinogenicity. The hydroxylation of chlorzoxazone has been proposed as a suitable probe for CYP2E1 in man (Kharasch et al. 1993; Peter et al. 1990), but recent reports

indicate that CYP1A2 and CYP3A4 contribute significantly to chlorzoxazone hydroxylation (Ono et al. 1995; Yamazaki et al. 1995).

In summary, this study suggests that the ^{14}C -NDMA breath test is a sensitive and specific probe for CYP2E1 activity *in vivo* in the rat. Comparison with other CYP2E1 probes such as chlorzoxasone will deserve further study.

Acknowledgements

The authors would like to give special thanks to Ginette Raymond and Jean-Luc Petit for technical assistance and to Manon Bourcier for secreterial assistance.

References

- Bhatt, H. S., and Combes, B. 1985. The effect of glutathione depletion on $^{14}\text{CO}_2$ evolution from [^{14}C] methyl-labeled aminopyrine in intact rats. *Hepatology*, **5**: 615-621.
- Brady, J. F., Ishizaki, H., Fukuto, J. M., Lin, M. C., Fadel, A., Gapac, J. M., and Yang, C. S. 1991a. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* **4**: 642-647.
- Brady, J. F., Wang, M. H., Hong, J. Y., Xiao, F., Li, Y., Yoo, J. S., Ning, S. M., Lee, M. J., Fukuto, J. M., Gapac, J. M., and Yang, C. S. 1991b. Modulation of rat hepatic microsomal monooxygenase enzymes and cytotoxicity by diallyl sulfide. *Toxicol. Appl. Pharm.* **108**: 342-354.
- Chen, L., Lee, M., Hong, J. Y., Huang, W., Wang, E., and Yang, C. S. 1994. Relationship between cytochrome P450 2E1 and acetone catabolism in rats as studied with diallyl sulfide as an inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **48**: 2199-2205.
- Dragnev, K. H., Nims, R. W., and Lubet, R. A. 1995. The chemoprotective agent diallyl sulfide. A structurally atypical phenobarbital-type inducer. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 2099-2104.

Ekström, G., and Ingelman-Sundberg, M. 1989. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-45011E1). *Biochem. Pharmacol.* **38**: 1313-1319.

Hayes, A. L., Marden, L. J., McGuire, M. V., and Cornell, N. W. 1988. Induction of rat hepatic microsomal drug metabolizing enzymes by pyrazole and 4-substituted pyrazoles. *Advances in Alcohol and Substance Abuse*, **7**: 199-203.

Heath D. F. The decomposition and toxicity of dialkylnitrosamines in rats. 1962. *Biochem. J.* **85**: 72-90.

Hickey, P. L., Angus, P. W., McLean, A. J., and Morgan, D. J. 1995. Oxygen supplementation restores theophylline clearance to normal in cirrhotic rats. *Gastroenterology*, **108**: 1504-1509.

Imaoka, S., Inoue, K., and Funae, Y. 1988. Aminopyrine metabolism by multiple forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes: simultaneous quantification of four aminopyrine metabolites by high-performance liquid chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.* **265**: 159-170.

Ishizaki, H., Brady, J. F., Ning, S. M., and Yang, C. S. 1990. Effect of phenethyl isothiocyanate on microsomal N-nitrosodimethylamine metabolism and other monooxygenase activities. *Xenobiotica*, **20**: 255-264.

Jorquera, R., Castonguay, A., and Schuller, H. M. 1994. DNA single-strand breaks and toxicity induced by 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone or N-nitrosodimethylamine in hamster and rat liver. *Carcinogenesis*, **15**: 389-394.

Kharasch, E. D., Thummel, K. E., Mhyre, J., and Lillibridge, J. H. 1993. Single-dose disulfiram inhibition of chlorzoxasone metabolism: a clinical probe for P450 2E1. *Clin. Pharmacol. Ther.* **53**: 643-650.

Korsrud, G. O., Grice, H. G., Goodman, T. K., Knipfel, J. E., and McLaughlan, J. M. 1973. Sensitivity of several serum enzymes for the detection of thioacetamide-, dimethylnitrosamine-, and diethanolamine-induced liver damage in rats. *Toxicol. Appl. Pharm.* **26**: 299-313.

Kroeger-Koepke, M. B., Koepke, S. R., Mc Clusky, G. A., Magee, P. N., and Michejda, C. J. 1981. α -Hydroxylation pathway in the *in vitro* metabolism of carcinogenic nitrosamines: N-nitrosodimethylamine and N-nitroso-N-methylaniline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 6489-6493.

Kwak, M. K., Kim, S. G., Kwak, J. Y., Novak, R. F., and Kim, N. D. 1994. Inhibition of cytochrome P4502E1 expression by organosulfur compounds allylsulfide, allylmercaptan and allylmethylsulfide in rats. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 531-539.

Lauterburg, B. H., and Bircher, J. 1976. Expiratory measurement of maximal aminopyrine demethylation *in vivo*: effect of phenobarbital, partial hepatectomy, portocaval shunt, and bile duct ligation in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **196**: 501-509.

Matsuda, T., Imaoka, S., Funae, Y., Otori, K., and Fukushima, S. 1995. Induction of CYP isoenzymes in various organs of rats by 3-methylcholanthrene or β -naphthoflavone. *Cancer Lett.* **97**: 137-143.

Mico, B. A., Swagzdis, J. E., Hu, H. S. W., Keefer, L. K., Oldfield, N. F., and Garland, W.A. 1985. Low-dose *in vivo* pharmacokinetic and deuterium isotope effect studies of N-nitrosodimethylamine in rats. *Cancer Res.* **45**: 6280-6285.

Monostory, K., and Vereczkey, L. 1994. The effect of phenobarbital and dexamethasone coadministration on the activity of rat liver P450 system. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **203**: 351-358.

Morimoto, M., Hagbjörk, A. L., Wan, Y. J. Y., Fu, P. C., Clot, P., Albano, E., Ingelman-Sundberg, M., and French, S. W. 1995. Modulation of experimental alcohol-induced liver disease by cytochrome P450 2E1 inhibitors. *Hepatology*, **21**: 1610-1617.

Morimoto, M., Hagbjörk, A. L., Nanji, A. A., Ingelman-Sundberg, M., Lindros, K. O., Fu, P. C., Albano, E., and French, S. W. 1993. Role of cytochrome P4502E1 in alcoholic liver disease pathogenesis. *Alcohol*, **10**: 459-464.

Ono, S., Hatanaka, T., Hotta, H., Tsutsui, M., Satoh, T., and Gonzalez, F. J. 1995. Chlorzoxazone is metabolized by human CYP1A2 as well as by human CYP2E1. *Pharmacogenetics*, **5**: 143-150.

Palakodety, R. B., Clejan, L. A., Krikun, G., Feierman, D. E., and Cederbaum, A. I. 1988. Characterization and identification of a pyrazole-inducible form of cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **263**: 878-884.

Park, K. S., Sohn, D. H., Veech, R. L., and Song, B. J. 1993. Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid. *Eur. J. Pharmacol.* **248**: 7-14.

Pegg, A. E., and Perry, W. 1981. Alkylation of nucleic acids and metabolism of small doses of dimethylnitrosamine in the rat. *Cancer Res.* **41**: 3128-3132.

Perri, F., Pastor, M., Annese, V., and Andriulli, A. 1994. The aminopyrine breath test. *Ital J Gastroenterol.* **26**: 306-317.

Peter, R., Böcker, R., Beaune, P.H., Iwasaki, M., Guengerich, F.P., and Yang, C.S. 1990. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem. Res. Toxicol.* **3**: 566-573.

- Renner, E., Wietholtz, H., Huguenin, P., Arnaud, M. J., and Preisig, R. 1984. Caffeine: a model compound for measuring liver function. *Hepatology*, **4**: 38-46.
- Roberts, B. J., Shoaf, S. E., and Song, B. J. 1995. Rapid changes in cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) activity and other P450 isozymes following ethanol withdrawal in rats. *Biochem. Pharmacol.* **49**: 1665-1673.
- Schaad, H. J., Renner, E. L., Wietholtz, H., Arnaud, M. J., and Preisig, R. 1995. Caffeine demethylation measured by breath test analysis in experimental liver injury in the rat. *J. Hepatol.* **22**: 82-87.
- Skipper, P. L., Tomera, J. F., Wishnok, J. S., Brunengraber, H., and Tannenbaum, S. R. 1983. Pharmacokinetic model of N-nitrosodimethylamine based on Michaelis-Menten constants determined with the isolated perfused rat liver. *Cancer Res.* **43**: 4786-4790.
- Tassaneeyakul, W., Birkett, D. J., McManus, M. E., Tassaneeyakul W., Veronese M. E., Andersson T., Tukey R. H. , and Miners J. O. 1994. Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes P450: contribution of 1A2, 2E1 and 3A isoforms. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1767-1776.
- Thomas, P. E., Bandiera, S., Maines, S. L., Ryan, D. E., and Levin, W. 1987. Regulation of cytochrome P-450j, a high-affinity N-nitrosodimethylamine demethylase, in rat hepatic microsomes. *Biochemistry*, **26**: 2280-2289.

Tsutsumi, M., Matsuda, Y., and Takada, A. 1993. Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 2E1 in the development of hepatocellular carcinoma by the chemical carcinogen, N-nitrosodimethylamine. *Hepatology*, **18**: 1483-1489.

Tu, Y. Y., and Yang, C. S. 1985. Demethylation and denitrosation of nitrosamines by cytochrome P-450 isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **242**: 32-40.

Villeneuve, J. P., Wood, A. J. J., Shand, D. G., Rogers, L., and Branch, R. A. 1978. Impaired drug metabolism in experimental cirrhosis in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **27**: 2577-2581.

Villeneuve, J. P., Arsène, D., and Huet, P. M. 1983. Assessment of liver function by the aminopyrine breath test. *Clin. Invest. Med.* **6**: 5-9.

Watkins, P. B., Murray, S. A., Winkelman, L. G., Heuman, D. M., Wrighton, S. A., and Guzelian, P. S. 1989. Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochrome P-450. Studies in rats and patients. *J. Clin. Invest.* **83**: 688-697.

Yamazaki, H., Guo, Z., and Guengerich, F. P. 1995. Selectivity of cytochrome P4502E1 in chlorzoxazone 6-hydroxylation. *Drug Metab. Dispos.* **23**: 438-440.

Yang, C. S., Yoo, J. S. H., Ishizaki, H., and Hong, J. 1990. Cytochrome P45011E1: Roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab. Rev.* **22**: 147-159.

Yoo, J. S. H., Ishizaki, H., and Yang, C. S. 1990. Role of cytochrome P45011E1 in the dealkylation and denitrosation of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, **11**: 2239-2243.

Table 1. Serum aminotransferase levels measured 24 hours after NDMA i.v. injection.

NDMA dose (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Alkaline phosphatase
0	30±1	69±3	184±17
5	28±4	68±8	200±40
10	40±4	75±8	158±19
15	49±6*	114±12*	185±27
20	52±4*	104±5*	195±25

Note: ALT = alanine aminotransferase, AST = aspartate aminotransferase. Results are expressed as mean ± SEM (n=4 rats /dose).

*p<0.05 compared to the 0 mg/kg dose.

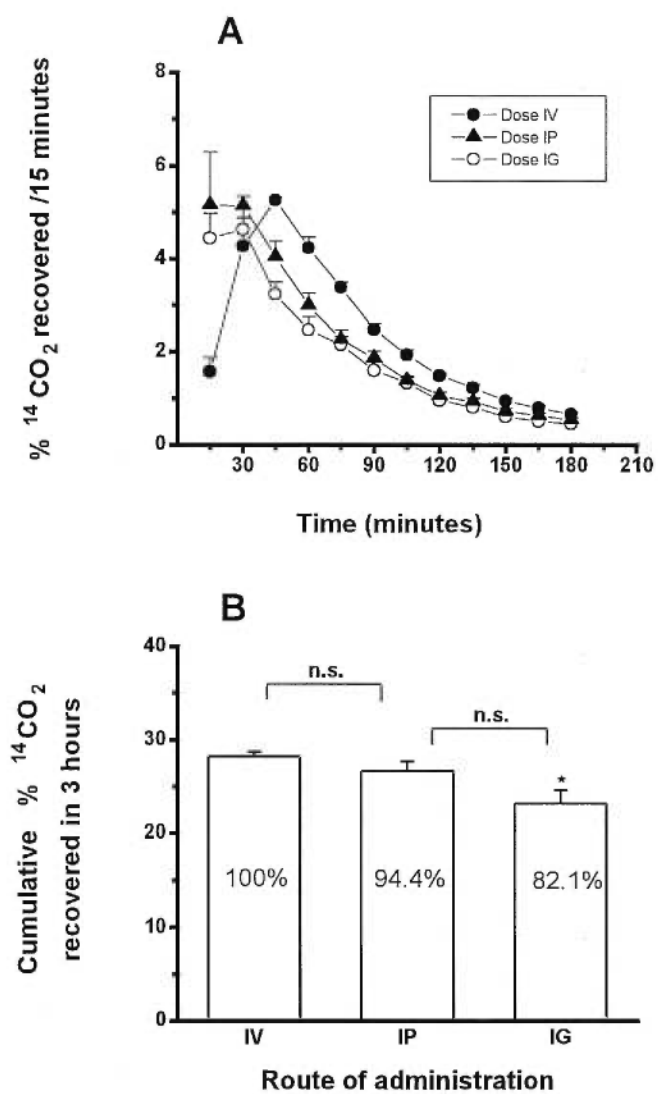


Figure 1: (A) % $^{14}\text{CO}_2$ recovered/15 minutes after the administration of a tracer dose of NDMA via 3 different routes: intravenous (IV), intraperitoneal (IP), and intragastric (IG). (B) Cumulative percentage of $^{14}\text{CO}_2$ recovered in 3 hours. Data are mean \pm SEM of 6 animals/group.

* $p < 0.05$ compared to IV administration.

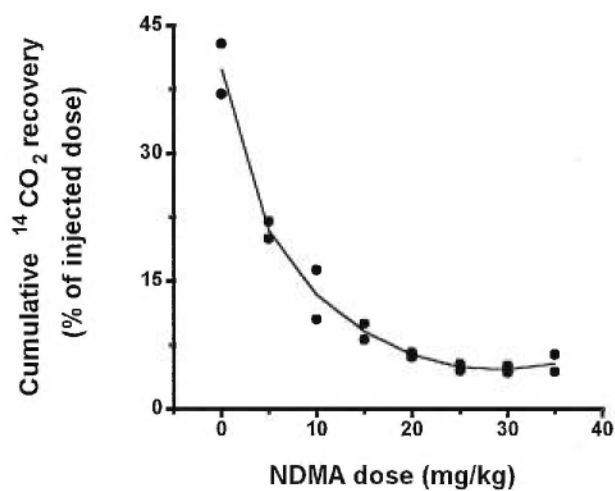


Figure 2: Demethylation rate versus dose: breath tests were performed with increasing doses of unlabeled NDMA and a tracer dose of ^{14}C -NDMA. Data points (●) represent the 2 hrs cumulative $^{14}\text{CO}_2$ output expressed as a percentage of the injected dose. (n=2 animals/dose).

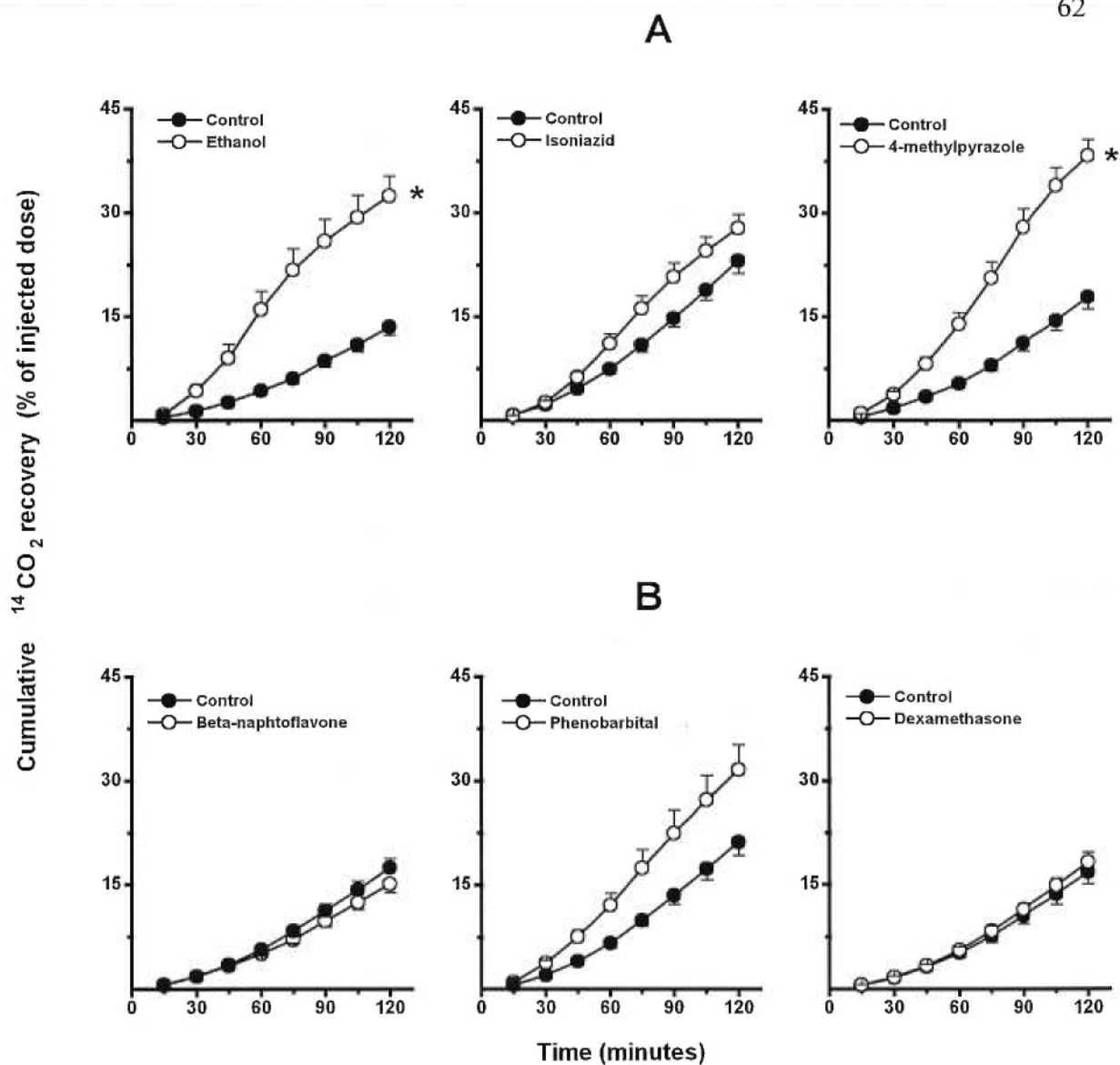


Figure 3: NDMA breath test: (A) Induction of CYP2E1 by ethanol (n=8), isoniazid (250mg/kg, n=6), and 4-methylpyrazole (50mg/kg, n=5). (B) Effect of inducers of CYP1A2 (beta-naphthoflavone 80mg/kg, n=6), CYP2B1 (phenobarbital 80mg/kg, n=4), and CYP3A2 (dexamethasone 10mg/kg, n=6) on the NDMA breath test. Data are mean \pm SEM. (●) Basal values, (○) after treatment.

* $p < 0.05$

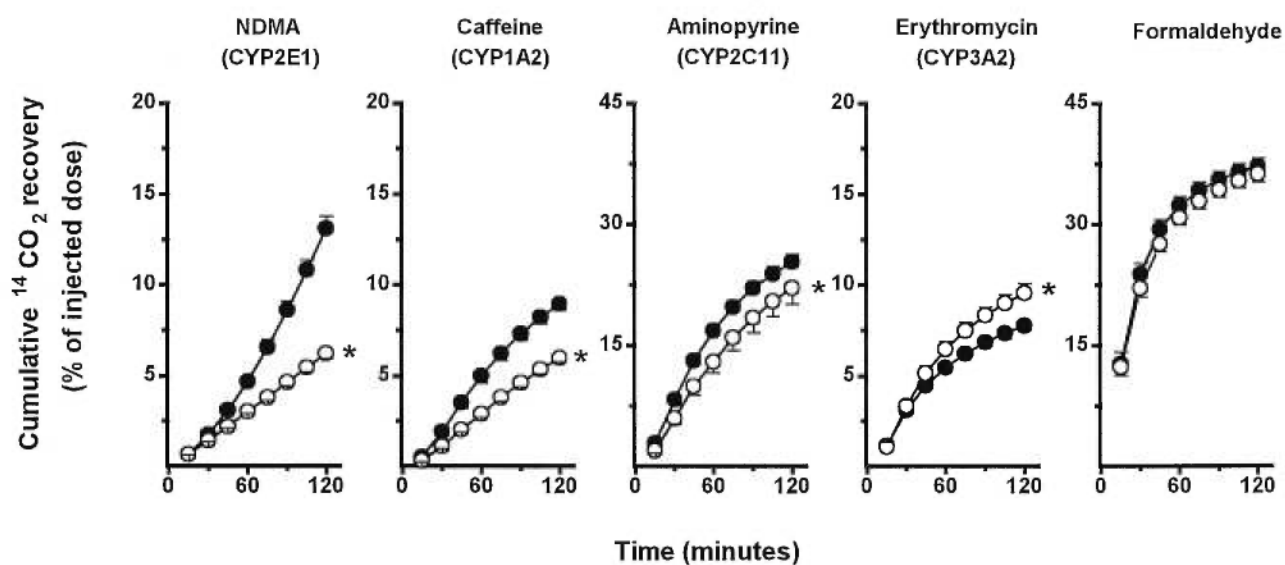


Figure 4: Effect of diallyl sulfide (200mg/kg) on the NDMA, the caffeine, the aminopyrine, the erythromycin and the formaldehyde breath tests. Data are mean \pm SEM of 6 animals/group. (●) Basal values, (○) after diallyl sulfide.

* $p < 0.05$

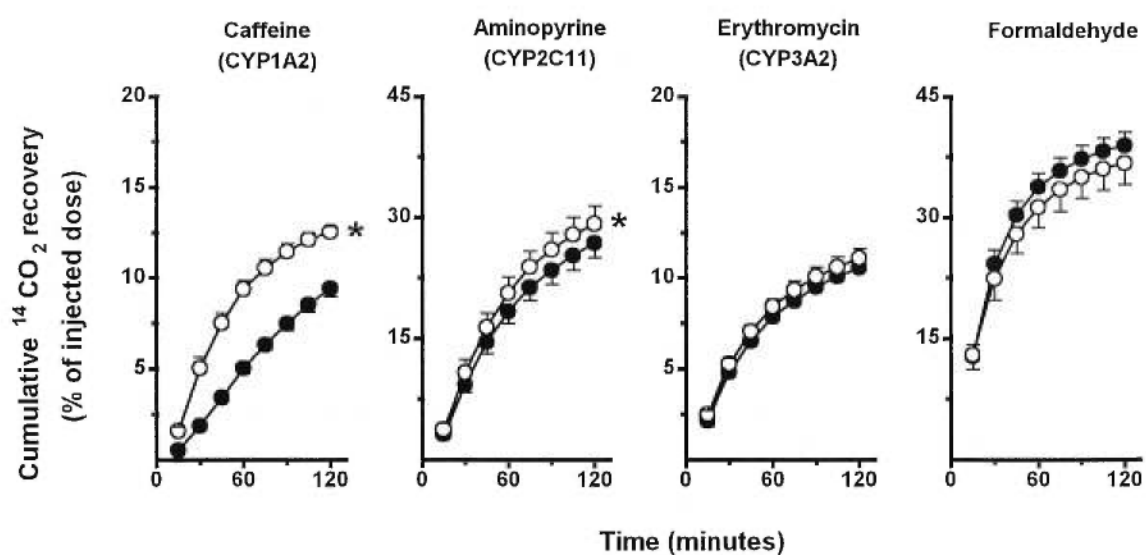


Figure 5: Effect of 4-methylpyrazole (50mg/kg) on the caffeine, the aminopyrine, the erythromycin and the formaldehyde breath tests. Data are mean \pm SEM of 6 animals/group (except for the formaldehyde breath test where n=5). (●) Basal values, (○) after 4-methylpyrazole.

* $p < 0.05$

Chapitre III.

**DIFFERENTIAL ALTERATION OF CYTOCHROME P450 ACTIVITIES IN
TWO EXPERIMENTAL MODELS OF CIRRHOSIS¹**

Marie-Claude Bastien and Jean-Pierre Villeneuve

Centre de recherche, Pavillon Saint-Luc, Centre hospitalier de l'Université de Montréal

and

Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Montréal,

Montréal, Canada.

¹ Cet article sera soumis à la revue Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.

Abstract

Hepatic diseases are associated with a decrease in cytochrome P450 catalytic activity and there is evidence that different types of cirrhosis result in different patterns of P450 changes. The objective of this study was to determine *in vivo* the changes in the activity of four cytochrome P450 isoenzymes in the bile duct ligation and carbon tetrachloride (CCl₄)-induced models of cirrhosis. Cytochrome P450 activity was evaluated with breath tests using substrates specific for different isoenzymes and labeled with ¹⁴C on methyl groups: caffeine (CYP1A2), aminopyrine (CYP2C11), nitrosodimethylamine (CYP2E1) and erythromycin (CYP3A2). Bile duct ligation resulted in biliary cirrhosis, and the caffeine, aminopyrine and erythromycin breath test results were reduced whereas the nitrosodimethylamine breath test result was unchanged when compared to controls. CCl₄ treatment resulted in cirrhosis of varying severity; although breath test results were decreased in some animals, this reduction did not reach statistical significance due to the large variance in the breath test results. However, the caffeine, aminopyrine, and erythromycin breath test results were reduced in the cirrhotic rats with more severe disease, as assessed from the decrease in liver weight. These results indicate that the catalytic activity of individual cytochromes P450 are differentially altered by the liver cirrhosis in the rat.

Key words: Breath test, cirrhosis, cytochrome P450, bile duct ligation, carbon tetrachloride

Résumé

Les maladies hépatiques sont accompagnées d'une diminution de l'activité des cytochromes P450 mais il semble que ces enzymes sont modulées de façon différentielle selon l'étiologie de la cirrhose. Le but de cette étude était de déterminer *in vivo* l'activité de quatre isoenzymes du cytochrome P450 dans deux modèles expérimentaux de cirrhose (ligature du cholédoque et traitement au CCl₄). L'activité des cytochromes P450 a été évaluée par des tests d'exhalaison utilisant des substrats marqués au ¹⁴C et spécifiques pour différentes isoenzymes du P450: la caféine (CYP1A2), l'aminopyrine (CYP2C11), la nitrosodiméthylamine (CYP2E1) et l'érythromycine (CYP3A2). Chez les rats avec une cirrhose biliaire induite par une ligature du cholédoque, les résultats des tests d'exhalaison à la caféine, à l'aminopyrine et à l'érythromycine étaient diminués tandis que le test d'exhalaison à la nitrosodiméthylamine était inchangé en comparaison avec les témoins. L'administration de CCl₄ a produit une cirrhose de sévérité variable et une grande variation dans les résultats des tests d'exhalaison chez ces animaux. Cependant, les résultats des tests d'exhalaison à la caféine, l'aminopyrine et l'érythromycine étaient diminués chez les rats avec une cirrhose plus sévère, tel qu'estimé par la diminution du poids du foie. Ces résultats indiquent que l'activité catalytique des cytochromes P450 n'est pas altérée de façon uniforme dans la cirrhose chez le rat.

Mots clés: Test d'exhalaison, cirrhose, cytochrome P450, ligature du cholédoque, tétrachlorure de carbone

Introduction

The cytochromes P450 (P450s) are a group of hemoproteins which catalyze the oxidative metabolism of a number of endogenous and exogenous compounds. They play a major role in the metabolism of drugs and facilitate their clearance by transforming them into substances that are more readily eliminated from the body. Hepatic diseases are associated with a reduction in the content of cytochromes P450 which can result in the impaired metabolism of drugs (Gervasi et al. 1989; Murray et al. 1987). Two theories have been proposed to explain the reduction of drug metabolism in hepatic diseases. The intact cell theory suggests that the enzymatic content of the hepatocytes is normal and that reduced drug metabolism is due to a reduced cell mass and/or abnormal perfusion of the liver (Wood et al. 1979); the sick cell hypothesis, in contrast, suggests that the enzyme content of the hepatocyte is altered in cirrhosis (Ohara et al. 1993).

There is accumulating evidence that P450 isoenzymes are differentially altered in cirrhosis and that some forms are more likely than others to be reduced (Buters et al. 1993; Murray et al. 1987; Roos et al. 1991). The activity of some P450s is decreased proportionally or to a greater extent than would be expected from the loss of cell mass whereas the activity of other isoenzymes is unchanged in cirrhosis (Farrell et al. 1979), suggesting the presence of a compensatory induction in order to maintain a normal function. In patients with severe cirrhosis, George et al. (1995) demonstrated a differential alteration in the hepatic content and catalytic activity of some cytochromes P450 when comparing cases of cholestatic versus non-cholestatic disease. Similarly, differences were reported between

cases of cirrhosis and hepatic carcinomas (Guengerich et al. 1991).

Breath tests have been developed as methods of evaluating the catalytic activity of cytochrome P450 isoenzymes by measuring the rate of demethylation of a drug. The formaldehyde generated by a P450 mediated demethylation reaction is rapidly oxidized and excreted as carbon dioxide in the breath. The rate of production of $^{14}\text{CO}_2$ from a suitable radiolabeled substrate reflects the *in vivo* rate of its demethylation and thus the catalytic activity of either a subset or a specific cytochrome P450. Various substrates have been used in breath tests to evaluate P450 activity *in vivo* in rats and humans. The aminopyrine breath test has often been used to evaluate liver function (Lauterburg and Bircher. 1976; Perri et al. 1994; Villeneuve et al. 1983). The caffeine and erythromycin breath tests have been used to measure both liver function and the catalytic activity of CYP1A2 and CYP3A2 isoenzymes (Renner et al. 1984; Schaad et al. 1995; Watkins et al. 1989). In our laboratory, we have recently described the use of a nitrosodimethylamine breath test to measure the activity of CYP2E1 in rats (Bastien and Villeneuve, 1997).

The aim of this study was to determine the effect of two different experimental models of cirrhosis on the activity of four cytochromes P450. The catalytic activity of CYP1A2, CYP2C11, CYP2E1 and CYP3A2 was measured *in vivo* with ^{14}C -breath tests using substrates specific for each isoenzyme.

Methods and materials

Materials

[Dimethyl-¹⁴C]-Aminopyrine (99 mCi/mmol), [1-Methyl-¹⁴C]-Caffeine (53.3 mCi/mmol), N-[Dimethyl-¹⁴C]-Erythromycin (55 mCi/mmol), [¹⁴C]-Formaldehyde (10 mCi/mmol), and N-[Dimethyl-¹⁴C]-Nitrosodimethylamine (57.6 mCi/mmol) were purchased from Dupont-New England Nuclear (Boston, MA). ¹²⁵INa was obtained from Amersham Canada Ltd, (Oakville, ON). Carbon tetrachloride and Fast Green FCF (no. 42053) were obtained from Fisher Scientific Co. (Montreal, Quebec). Sirius Red F3B (no. 34149) was from Atomergic Chemetals Corp. (Plainview, N.Y.). Goat antirabbit Ig G was purchased from Fitzgerald (Concord, MA). The Bradford reagent was obtained from Bio-Rad (Mississauga, ON). All other reagents were of the highest purity commercially available.

Experimental models of cirrhosis

All animals were housed two per cage on a 12 hour light-dark cycle with free access to a normal chow diet (Purina rat chow) and water. All animal work was approved by our institution's animal protection committee. Animals were taken care of in accordance to the guidelines set by the Canadian Council on Animal Care. For the bile duct ligation model, male Sprague-Dawley rats (Charles Rivers Canada Ltd., St-Constant, Qué.) weighing between 225 and 275g at the time of surgery were used. Biliary cirrhosis was induced by the method described by Huet et al. (1995). Animals were anesthetized with isoflurane; following a midline abdominal incision, the common bile duct was isolated and

cleared of connective tissue. After a first distal ligation, 10% formalin (400 μ l/275g) was slowly injected into the bile duct using a 25 \times 8G needle attached to a tuberculin syringe by PE10 tubing. A second proximal ligation was quickly tied and the bile duct transected. Immediately after surgery animals were given ampicillin (150mg/kg i.v.), buprenorphine (1 μ l/g s.c.), and vitamin K (150 μ l i.m). In sham operated controls, the bile duct was simply exposed and 150 μ l of sterile saline was given instead of vitamin K. Bile duct ligated (BDL) and sham operated animals received weekly injections of 150 μ l of vitamin K and saline respectively. Breath tests were performed between the 42nd and the 46th day after surgery.

CCl₄-cirrhosis was induced following the procedure described by Proctor and Chatamra (1982). Male Sprague-Dawley rats weighing about 250g were given phenobarbital (35 mg/dl) in drinking water to enhance the hepatic toxicity of CCl₄. The first dose of CCl₄ (0.16 ml in 0.5 ml of corn oil) was administered by gastric gavage on day 10 of phenobarbital treatment. Successive twice-weekly doses were administered between 9 and 10 a.m. and varied individually to maintain a critical level of hepatic damage as reflected by the fluctuation in the body weight of each animal. The duration of the treatment varied between 8-10 weeks. Control animals received phenobarbital in their drinking water and corn oil (0.5 ml) twice a week by gastric gavage. Phenobarbital and CCl₄ administration were stopped 10 days before breath test studies. In both models, the presence of cirrhosis was confirmed histologically.

Breath tests

Under isoflurane anaesthesia, rats received approximately 0.25 μCi of a radioactive substrate administered intravenously (i.v.) in the penial vein. The animals were then placed in glass breathing chambers. The breath test apparatus used was similar to that described by Villeneuve et al. (1978). The air exhaled was directed through a system of tubes attached to the restraining glass chamber by the action of vacuum pressure. The air was passed through a dehumidifying column of Drierite to remove water vapor and bubbled through a solution of 10 ml methanol-ethanolamine 2:1 (v/v) which trapped $^{14}\text{CO}_2$ exhaled by the rat. Collections of exhaled $^{14}\text{CO}_2$ were performed at 15 min intervals for two hours, in interchangeable glass scintillation vials containing the trapping solution. Ten ml of scintillation fluid (Hionic fluor) was added to each vial and the content of ^{14}C was determined using a β counter (Beckman LS1801). For each rat, breath tests were generally performed on consecutive days, in a randomized order, using substrates specific for the different cytochromes P450: caffeine (CYP1A2), aminopyrine (CYP2C11), nitrosodimethylamine (CYP2E1) and erythromycin (CYP3A2). In the caffeine and erythromycin breath tests rats received 0.25 μCi of a tracer dose of the ^{14}C -labeled substrates. For the aminopyrine breath test, animals received a dose of 50 mg/kg of unlabeled aminopyrine together with the ^{14}C -tracer dose. For the nitrosodimethylamine breath test, animals received a dose of 10 mg/kg of unlabeled nitrosodimethylamine in addition to the ^{14}C -tracer dose. A breath test using a tracer dose of ^{14}C -formaldehyde was done to evaluate the effect of the experimental models of cirrhosis on formaldehyde metabolism. Breath tests were performed in a randomised order. All breath tests done from the second day on were immediately preceded by a 45 minutes evaluation of the

residual excretion of $^{14}\text{CO}_2$ from the substrate injected on the previous day. This “background” radioactivity was subtracted from the counts obtained on that day.

The rate of $^{14}\text{CO}_2$ exhalation over 2 hours was expressed as the percentage of administered radiolabel recovered in breath plotted as a function of time (per 15 min intervals). Results are presented as the cumulative amount of $^{14}\text{CO}_2$ exhaled over 2 hours.

Blood sampling and liver histology

Twenty four hours after the last breath test, animals were anesthetized with an i.p. injection of sodium pentobarbital (65 mg/kg). The abdominal cavity was opened via a midline incision in sham animals and a lateral incision in bile duct ligated and CCl_4 -treated rats (to prevent bleeding from blood vessels at the site of incision). Ascites was collected when present. A 3 ml blood sample was taken from the inferior vena cava and serum was separated and stored at -70°C for biochemical analysis. The liver was then thoroughly perfused *in situ* through the portal vein with 100 ml of cold heparinized 0.9% saline solution, removed and weighed. Two pieces were taken from the median lobe and placed in 10% formalin at 4°C for histology. Serum bilirubin, ALT, AST and alkaline phosphatase levels were determined in control and cirrhotic animals. Total serum protein concentration was determined using the Bradford method, using bovine serum albumin as standard (Bradford,1976). One control and one cirrhotic rat from the CCl_4 group died after the last breath test and blood samples were not available in these animals.

Determination of serum albumin concentration

Antiserum. Antialbumin antiserum was produced in male New Zealand rabbits. Briefly, rabbits were first immunized with a solution of 400 µg/ml of rat albumin in complete Freund's adjuvant. 200 µg of rat albumin was injected at 25 different sites. A second immunization was performed 34 days later with 200 µg of rat albumin in incomplete Freund's adjuvant. Antibody production was monitored regularly. Three months after the first immunization, rabbits were bled under pentobarbital anesthesia. The blood was collected from the aorta, serum was separated and stored in 5 ml aliquots at -70°C.

Iodination and purification of the tracer. Rat albumin was iodinated with ^{125}I Na by a modification of Hunter and Greenwood's method (1962). The tracer was further purified by gel chromatography by a modification of D'Amour et al. (1984).

Radioimmunoassay. All components were diluted in 0.05 M barbital buffer, pH 8.6 containing 0.1% porcine skin gelatin. Rat sera or rat albumin standards were incubated for 24 hours with a solution containing normal rabbit serum, the barbital buffer, rabbit antialbumin antiserum, and iodinated albumin. The samples were next incubated 24 hours with goat antirabbit Ig G antibody. The samples were then centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatant was discarded and the pellet was counted in a LKB Wallac Gamma counter (Gamma Master). All work was carried out at room temperature.

Determination of hepatic collagen content

The amount of collagen and non-collagenous protein in the liver was measured in CCl₄-treated and control rats by the colorimetric method described by Jiminez et al. (1985). Briefly, 15 µm sections of paraffin embedded liver tissue were deparaffinized and incubated in a 0.04% solution of Fast Green FCF in saturated picric acid for 15 min. The sections were washed until the supernatant was clear and then incubated in a solution of Fast Green FCF 0.1% and Sirius Red F3B 0.04% for 30 min and washed as described above. The dyes were eluted with 1 ml of 0.1% NaOH in absolute methanol (1:1, v:v) and their absorbance was measured in a lambda 4B P.E. spectrophotometer (Perkin-Elmer; Norwalk, CT) at 531 and 604 nm (corresponding to the maximal absorbance of Sirius Red and Fast Green, respectively). Collagenous and non-collagenous protein determination were obtained by using the formulas described by Jiminez et al. (1985).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± standard error (SEM). Differences between control and experimental groups were determined using a student's t-test. Correlations were determined by a linear regression analysis. A probability of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Descriptive features of the models of cirrhosis

At the time of sacrifice, the rat's body weights were lower in the cirrhotic animals than in their respective controls. In the bile duct ligated rats, both the absolute liver weight and the liver weight/100g body weight were greater in the cirrhotic animals than in the sham-operated controls. There was no difference in liver weight between the CCl₄-cirrhotic and CCl₄-control groups of rats (Table 1). Serum bilirubin, AST, ALT, and alkaline phosphatase levels were increased in bile duct-ligated rats when compared to sham-operated animals (Table 1). In CCl₄-treated rats, serum bilirubin concentrations were normal but AST, ALT, and alkaline phosphatase levels were significantly higher than in control rats. Serum albumin concentration was significantly decreased in bile duct ligated rats but not in CCl₄-treated animals (Table 1). There was a positive correlation between serum albumin concentration and rat liver weight expressed in g/100g body weight in the CCl₄-treated animals (Figure 1). This relationship was not found in the bile duct ligated rats.

Histological evaluation of the livers from CCl₄-treated rats showed the presence of cirrhosis in all animals, with thin fibrous septa surrounding hepatocyte nodules (Figure 2B). Examination of livers from bile duct ligated rats showed bile ductular proliferation and secondary biliary cirrhosis (Figure 2C).

Effect of secondary biliary cirrhosis and CCl₄-induced cirrhosis on cytochrome P450 activity measured *in vivo* using ¹⁴C-breath tests.

In rats with biliary cirrhosis, there was a reduction in the caffeine (CYP1A2), the aminopyrine (CYP2C11), and the erythromycin breath tests (CYP3A2) but the nitrosodimethylamine breath test (CYP2E1) remained comparable to controls (Table 2). The erythromycin breath test result of one of the bile duct ligated animal was excluded from data analysis because the ¹⁴C-erythromycin tracer dose was delivered subcutaneously instead of intravenously. In the CCl₄ rats, none of the breath tests were significantly reduced when compared to controls (Table 2). No significant differences were found in the percentage of ¹⁴CO₂ exhaled following the administration of ¹⁴C- formaldehyde between the control and cirrhotic animals in any of the experimental models (Table 2).

An important variation was observed in the breath tests results, particularly in the CCl₄-cirrhotic animals (Figure 3). In an attempt to explain this variation, a correlation was sought between breath tests results and the severity of cirrhosis as determined by (1) the serum albumin concentration, (2) the liver weight, and (3) the liver's collagen content. Serum albumin concentration correlated with the aminopyrine and nitrosodimethylamine breath tests in the CCl₄-treated rats (Figure 4) and with the aminopyrine, nitrosodimethylamine, erythromycin, and formaldehyde breath tests in the bile duct ligated animals (Figure 5). There was a good correlation between the ¹⁴CO₂ output following the administration of ¹⁴C-labeled caffeine, aminopyrine, nitrosodimethylamine, and erythromycin and the liver weight of rats in CCl₄-treated animals (Figure 6) but not in bile duct ligated rats. No relation was found between the liver's collagen content and breath test result in the CCl₄-treated animals.

Discussion

Cytochrome P450 activity is known to be decreased in cirrhosis. Some P450 isoenzymes seem more susceptible than others to being reduced and the pattern of changes in cytochrome P450 activity may differ according to the cause of liver disease. The present study demonstrates that the cytochrome P450-mediated metabolism of four substrates is differentially altered in biliary cirrhosis and to a lesser extent in CCl₄-induced cirrhosis.

Previous studies have demonstrated that cytochrome P450 isoenzymes are not equally affected in hepatic diseases. The activities of CYP1A1/2, CYP2B1 and CYP2C11 are generally decreased in cirrhosis whereas inconsistent results were reported for P450s such as CYP2E1 and CYP3A2 (Buters et al. 1995; Farrell et al. 1979; George et al. 1995; Murray et al. 1986, 1987; Roos et al. 1991). Studies investigating P450 content and catalytic activity in different types of liver diseases have reported conflicting results. In humans, Guengerich et al. (1991) measured the amount of several P450s per mg of microsomal protein in normal liver tissue, in cirrhotic livers, in liver tissue with metastasis, and in a group of samples with different liver diseases (sclerosing cholangitis, fibrosis, Wilson's disease, acute hepatitis, paucity of hepatic bile ducts, neonatal giant cell hepatitis, primary graft failure, adult polycystic liver disease, and others). They found a reduction of CYP1A2 in the cirrhotic liver samples and in the samples from the group comprising other types of liver diseases. CYP2E1 was reduced only in cirrhotic livers while the amount of CYP3A was not significantly decreased in cirrhosis. The important heterogeneity within each of the group studied with respect to the etiology of the liver

disease makes it difficult to interpret these results. George et al. (1995) found CYP2E1 to be reduced in cholestatic liver disease but not in other forms of cirrhosis, whereas CYP3A was normal in cholestatic diseases but reduced in non cholestatic cirrhosis. CYP1A2 was decreased in both types of cirrhosis. From these results, the authors suggested that P450 expression may depend on the cause of the liver disease. In rats with thioacetamide-induced cirrhosis, Gervasi et al. (1989) reported a decrease in the CYP1A1 and CYP1A2-related microsomal ethoxyresorufin *O*-deethylase and ethoxycoumarin *O*-deethylase activity. In another study, Buters et al. (1993) examined antipyrine metabolism in rats with cirrhosis induced by bile duct ligation and CCl₄. They reported that the production of 3-OH-antipyrine was reduced while the formation of 4-OH-antipyrine was maintained in both the bile duct ligation and CCl₄ models of cirrhosis. On the other hand, norantipyrine formation was decreased in CCl₄-treated rats but unchanged in bile duct ligated animal. From their observations, they concluded that the etiology of the liver disease was not a major determinant on P450 changes in cirrhosis.

In the present study, two different experimental models were used: the bile duct ligation and CCl₄-induced models of cirrhosis. Bile duct ligation in the rat results in secondary biliary cirrhosis with cholestasis characterized by the accumulation of bile acids in serum and liver. In this model, the microsomal function was shown to decrease when expressed per hepatocyte volume (Ohara et al. 1993). It has been suggested that the reduced hepatic content and activity of P450s may be due to bile acid-mediated destruction of hemoproteins (Hutterer et al. 1970). It has also been proposed that a decrease in protein synthesis, as evidenced by decreased incorporation of radiolabeled amino acids into

microsomal proteins, was the main reason for reduced level of P450s in bile duct ligation-induced cirrhosis (Mackinnon et al. 1974). CCl₄-induced cirrhosis is an experimental model which resembles alcoholic cirrhosis in man. CCl₄ toxicity is thought to result from the conversion of CCl₄ by CYP2E1 to the carbon trichloro free radical (CCl₃) and to other free radical derivatives which form covalent bonds with liver macromolecules and lead to hepatotoxicity (Maling et al. 1975). Several observations suggest that the intact cell hypothesis applies to the CCl₄-induced micronodular cirrhosis. Wu et al. (1991) reported that in CCl₄-cirrhosis the activities of aniline *p*-hydroxylase, aminopyrine *N*-demethylase, and 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase were unchanged and that the induction of the mixed-function oxidase system by phenobarbital and 3-methylcholanthrene was unaffected by cirrhosis.

In both groups of cirrhotic animals, the nitrosodimethylamine breath test was not significantly different from controls. The caffeine, aminopyrine and erythromycin breath tests were reduced in the biliary cirrhosis model. Decreases in caffeine and aminopyrine oxidative metabolism were also reported in rats with cholestasis in studies by Schaad et al. (1995) and Roos et al. (1991). In contrast to the results obtained in humans by George et al. (1995) who reported no change in CYP3A-mediated testosterone 6 β -hydroxylase activity in cholestatic liver diseases, we found the CYP3A2-mediated demethylation of erythromycin to be reduced in our cholestatic model of cirrhosis.

In the CCl₄-treated rats, we found no significant difference in the activity of any of the cytochromes P450 studied when compared to control animals. CCl₄ administration causes

hepatic lesions which can vary greatly in severity from one animal to another (Gascon-Barré et al. 1980). In this study, although CCl₄-treated animals presented external signs which suggested the presence of cirrhosis such as ascites, pale mucous membrane, and nasal bleeding, none of them developed severe cirrhosis histologically. The large variation in the liver weight of the CCl₄-treated rats contrasts with the uniformity of the histological lesions produced in these animals. There was a positive correlation between breath test results and the liver weight of rats. In the presence of cirrhotic lesions of comparable severity, a smaller liver size must result in the presence of fewer functional hepatocytes which could in turn explain the reduced breath test values in these animals. It is interesting to note that the caffeine, aminopyrine and erythromycin breath tests were more severely impaired in the three CCl₄-cirrhotic animals with the smallest liver size. Although not significant because of the small number of CCl₄-treated rats involved, this observation suggests that, in cases of severe cirrhosis, the bile duct ligation and CCl₄-induced cirrhosis may affect P450 activity in a similar fashion.

Serum albumin concentration reflects the capacity for albumin synthesis and is a good indicator of the severity of liver disease. The serum albumin concentration was closely related to the aminopyrine and nitrosodimethylamine breath tests in the two experimental groups of rats. However, the aminopyrine breath test was the only one of the two breath test to be reduced in the model of biliary cirrhosis. These results suggest that aminopyrine metabolism is particularly affected in cirrhosis and may be the best substrate to assess hepatic functional reserve in liver disease.

In summary, using ^{14}C -breath tests, it was determined that the catalytic activity of several but not all P450s is reduced in cirrhosis. Our results provide further evidence that the activity of individual P450 isoenzymes are differentially altered in cirrhosis and stresses the importance of choosing appropriate substrates for quantitative liver function tests.

Acknowledgements

The authors would like to give special thanks to Ginette Raymond and Jean-Luc Petit for their technical assistance.

References

- Babany, G., Descatoire, V., Corbic, M., Gendre, S., Degott, C., Larrey, D., Letteron, P., Wandscheer, J. C., Funck-Brentano, C., and Pessayre, D. 1985. Regulation of renal cytochrome P-450. Effect of two-thirds hepatectomy, cholestasis, biliary cirrhosis, and post-necrotic cirrhosis on hepatic and renal microsomal enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **34**: 311-320.
- Bastien, M. C. and Villeneuve, J. P. 1997. Characterization of cytochrome P450 2E1 activity by the ¹⁴C-nitosodimethylamine breath test. *Can. J. Gastroenterol.* (Abstract in press).
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Buters, J. T. M., Zysset, T., and Reichen, J. 1993. Metabolism of antipyrine *in vivo* in two rat models of liver cirrhosis. Its relationship to intrinsic clearance *in vitro* and microsomal membrane lipid composition. *Biochem. Pharmacol.* **46**: 983-991.
- D'Amour, P., Labelle, F., and Lazure, C. 1984. Comparison of four different carboxylterminal tracers in a radioimmunoassay specific to the 68-84 region of human parathyroid hormone. *J. Immunoassay*, **5**: 183-204.

Farrell, G. C., Cooksley, W. G. E., and Powell, L. W. 1979. Drug metabolism in liver disease: activity of hepatic microsomal metabolizing enzymes. *Clin. Pharmacol. Ther.* **26**: 483-492.

Gascon-Barré, M., Huet, P. M., Belgiorno, J., Plourde, V., and Coulombe, P. A. 1989. Estimation of collagen content of liver specimens. Variation among animals and among hepatic lobes in cirrhotic rats. *J. Histochem. Cytochem.* **37**: 377-381.

George, J., Murray, M., Byth, K., and Farrell, G. C. 1995. Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology*, **21**: 120-128.

Gervasi, P. G., Longo, V., Marzano, M., Saviozzi, M., and Malvadi, G. 1989. Chronic liver injury by thioacetamide and promotion of hepatic carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **115**: 29-35.

Guengerich, F. P., and Turvy, C. G. 1991. Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxyde hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**: 1189-1194.

Huet, P. M., Colombato, L., Imamura, H., Rocheleau, B., Brault, A., and Giroux, L. 1995. Hepatic microcirculation changes in a new model of biliary cirrhosis associating formalin injection and ligation of the bile ducts in the rat. *Gastroenterology*, **108**: A1087.

Hunter, W. M., and Greenwood, F. C. 1962. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature (Lond.)*, **194**: 495-496.

Hutterer, F., Denk, H., Bacchin, P. G., Sckenkman, J. B., Schaffner, F., and Popper, H. 1970. Mechanism of cholestasis. 1. Effect of bile acids on microsomal cytochrome P-450 dependent biotransformation system *in vitro*. *Life Sci.* **9**: 877-887.

Jimenez, W., Parés, A., Caballería, J., Heredia, D., Bruguera, M., Torres, M., Rojkind, M., and Rodés, J. 1985. Measurement of fibrosis in needle liver biopsies: evaluation of a colorimetric method. *Hepatology*, **5**: 815-818.

Lauterburg, B. H., and Bircher, J. 1976. Expiratory measurements of maximal aminopyrine demethylation *in vivo*: effect of phenobarbital, partial hepatectomy, portocaval shunt, and bile duct ligation in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **196**: 501-509.

Mackinnon, A. M., and Simon, F. R. 1974. Reduced synthesis of hepatic microsomal cytochrome P₄₅₀ in the bile duct ligated rat. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **56**: 437-443.

Maling, H. M., Stripp, B., Sipes, I. G., Highman, B., Saul, W., and Williams, M. A. 1975. Enhanced hepatotoxicity of carbon tetrachloride, thioacetamide and dimethylnitrosamine by pretreatment of rats with ethanol and some comparisons with potentiation by isopropanol. *Toxicol. Appl. Pharm.* **33**: 291-308.

Murray, M., Zaluzny, L., and Farrell, G. C. 1986. Drug metabolism in cirrhosis. Selective changes in cytochrome P-450 isozymes in the choline-deficient rat model. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 1817-1824.

Murray M., Zaluzny L., Farrell G. C. 1987. Impaired androgen 16 α -hydroxylation in hepatic microsomes from carbon tetrachloride-cirrhotic male rats. *Gastroenterology*, **93**: 141-147.

Ohara, N., Schaffner, T., and Reichen, J. 1993. Structure-function relationship in secondary biliary cirrhosis in the rat. Stereologic and hemodynamic characterization of a model. *J. Hepatol.* **17**: 155-162.

Perri, F., Pastor, M., Annese, V., Andriulli, A. 1994. The aminopyrine breath test. *Ital. J. Gastroenterol.* **26**: 306-17.

Proctor, E., and Chatamra, K. 1982. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*, **83**: 1183-1190.

Renner, E., Wietholtz, H., Huguenin, P., Arnaud, M. J., and Preisig, R. 1984. Caffeine: a model compound for measuring liver function. *Hepatology*, **4**: 38-46.

Roos, F. J., Zysset, T., and Reichen, J. 1991. Differential effect of biliary and micronodular cirrhosis on oxidative drug metabolism. *In vitro-in vivo* correlations of dextromethorphan metabolism in rat models. *Biochem. Pharmacol.* **41**: 1513-1519.

Schaad, H. J., Renner, E., Wietholtz, H., Arnaud, M. J., and Preisig, R. Caffeine demethylation measured by breath test analysis in experimental liver injury in the rat. *J. Hepatol.* **22**: 82-87, 1995.

Villeneuve, J. P., Wood, A. J. J., Shand, D. G., Rogers, L., and Branch, R. A. 1978. Impaired drug metabolism in experimental cirrhosis in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **27**: 2577-2581.

Villeneuve, J. P., Arsène, D., and Huet, P. M. 1983. Assessment of liver function by the aminopyrine breath test. *Clin. Invest. Med.* **6**: 5-9.

Watkins, P. B., Murray, S. A., Winkelman, L. G., Heuman, D. M., Wrighton, S. A., and Guzelian, P. S. 1989. Erythromycine breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochrome P-450. *Studies in rats and patients. J. Clin. Invest.* **83**: 688-697.

Wood, A. J. J., Villeneuve, J. P., Branch, R. A., Rogers, L. W., and Shand, D. G. 1979. Intact hepatocyte theory of impaired drug metabolism in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*, **76**: 1358-1362.

Wu, Z., Piché, D., Vallières, S., Huet, P. M., and Gascon-Barré, M. 1991. Unimpaired induction of drug-metabolizing enzymes in hepatocytes isolated from rats with micronodular cirrhosis. *Can. J. Physiol. Pharm.* **69**: 426-436.

Table 1. Effect of biliary and CCl₄-induced cirrhosis on biochemical and physical parameters.

	Experimental models of cirrhosis			
	Bile duct ligation (BDL)		Carbon tetrachloride (CCl ₄)	
	Control	BDL	Control	CCl ₄
(n)	6	7	5	8
Body weight (g)	465.8±11.3	379.4±11.8*	558.0±25.6	422.2±15.8*
Liver weight				
(g)	16.4±0.5	26.2±0.8*	20.6±0.9	16.95±2.0
(g/100g body weight)	3.5±0.1	6.9±0.2*	3.7±0.2	3.9±0.4
Ascites (n/group)	0/6	3/7	0/5	5/8
Serum total proteins (g/L)	54.7±3.2	54.7±4.7	65.1±3.4	49.1±5.6
Serum albumin (g/L)	37.0±3.6	25.3±2.7*	37.1±2.1	26.6±3.8
Serum bilirubin (µmol/L)	3.2±0.7	156.5±6.9*	2.9±0.7	5.4±2.1
AST (U/L)	76.4±6.1	402.9±60.1*	87.2±14.1	180.0±18.5*
ALT (U/L)	45.0±3.9	85.4±9.7*	44.4±0.9	102.3±7.9*
Alkaline phosphatase (U/L)	149.2±14.1	250.0±26.9*	97.6±16.8	236.6±42.7*
Collagen content (µg/mg protein)	N.D.	N.D.	4.4±0.4	9.6±0.7*

Results are expressed as mean ± SEM.

N.D. Not determined

**p* <0.05 compared with controls

Table 2. Effect of biliary and CCl₄-induced cirrhosis on [¹⁴C] breath tests.

Breath test	Experimental models of cirrhosis			
	Control	BDL	Control	CCl ₄
(<i>n</i>)	6	7	6	9
Caffeine	6.1±0.7	2.2±0.5*	5.6±0.2	3.7±0.9
Aminopyrine	20.2±1.9	13.0±2.1*	21.0±1.3	15.5±2.8
Nitrosodimethylamine	11.4±0.8	18.6±3.0	10.7±1.0	13.8±2.1
Erythromycin	10.7±0.8	5.7±1.0*†	9.6±1.2	7.6±1.0
Formaldehyde	43.2±1.0	41.2±2.5	42.4±1.9	36.9±2.3

Values represent the 2 hrs cumulative ¹⁴CO₂ output expressed as a percentage of the injected dose. Results are expressed as mean ± SEM.

**p* < 0.05 compared with controls

† *n*=6 for the erythromycin breath test

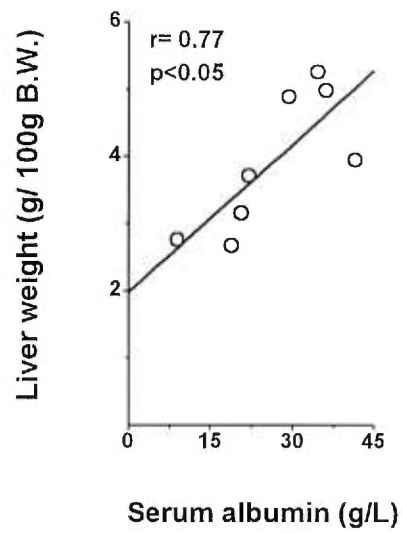
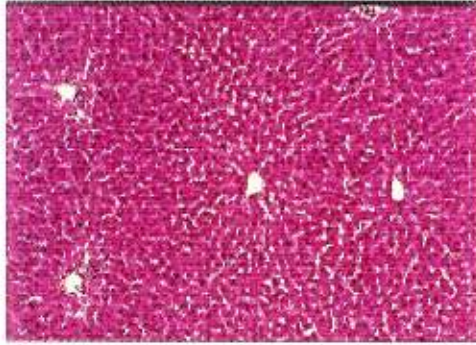
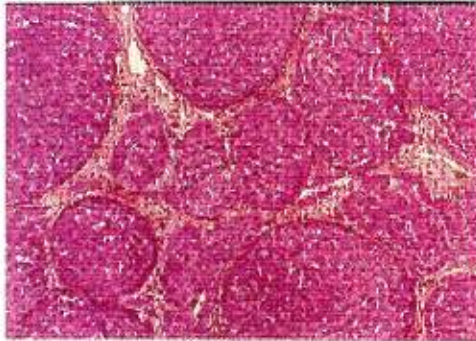


Figure 1: Correlation between serum albumin concentration (g/L) and rat liver weight (g liver/100 g body weight) in CCl₄-cirrhotic animals (O, n=8).

(A)



(B)



(C)

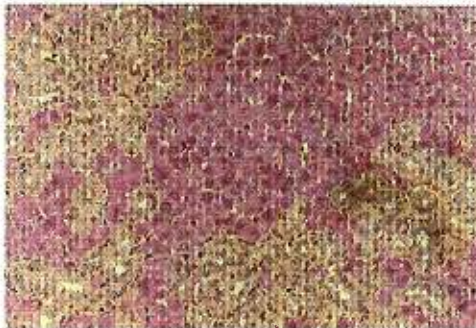


Figure 2. Representative liver histology demonstrating (A) control rat liver; H&E 10x (B) micronodular cirrhotic liver; H&E 10x, and (C) bile ductular proliferation in a bile duct ligated animal; H&E 25x.

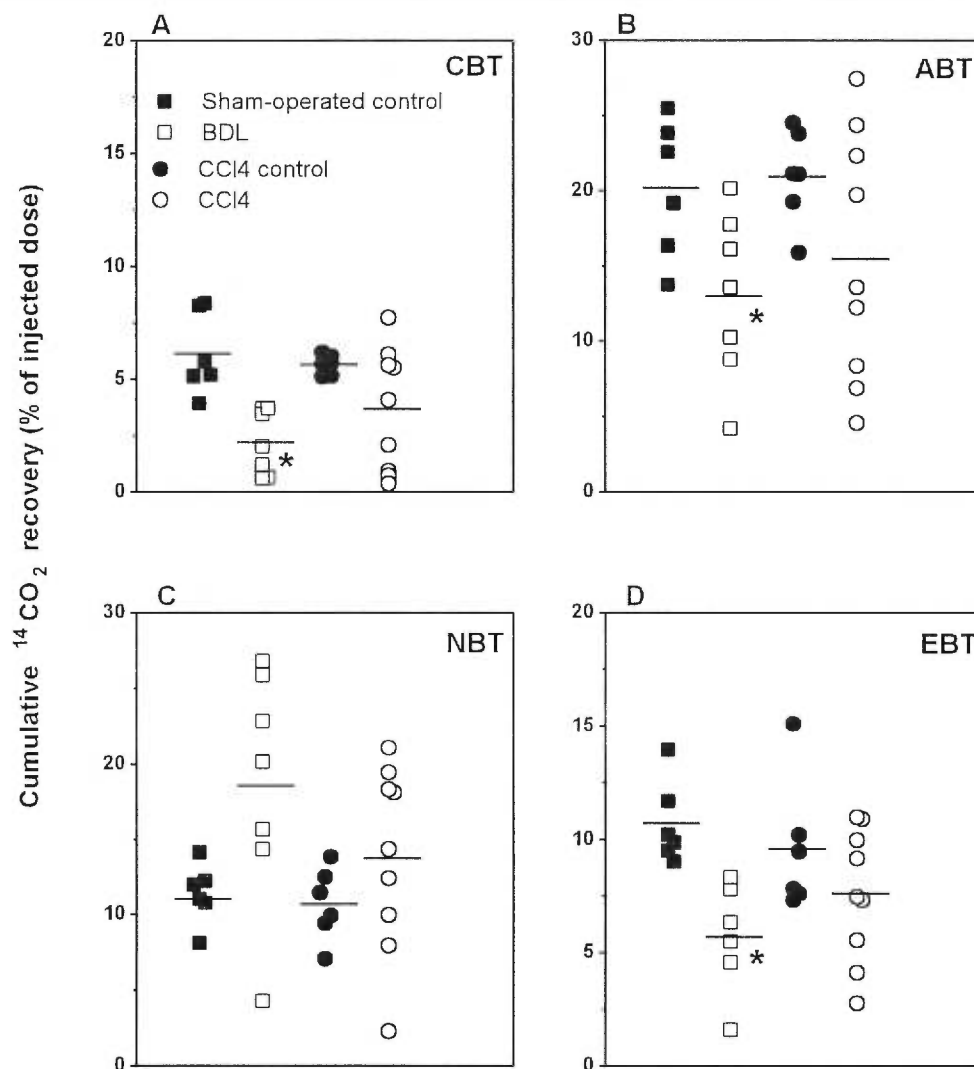


Figure 3: Effect of biliary cirrhosis (\square , $n=7$ except for EBT where $n=6$) and CCl_4 -induced cirrhosis (\circ , $n=9$) on the [^{14}C] (A) caffeine (CBT), (B) aminopyrine (ABT), (C) nitrosodimethylamine (NBT) and (D) erythromycin (EBT) breath tests. (\blacksquare sham operated controls [$n=6$], \bullet controls for CCl_4 animals [$n=6$]). The groups means are indicated by horizontal lines.

* $p < 0.05$ compared to the controls

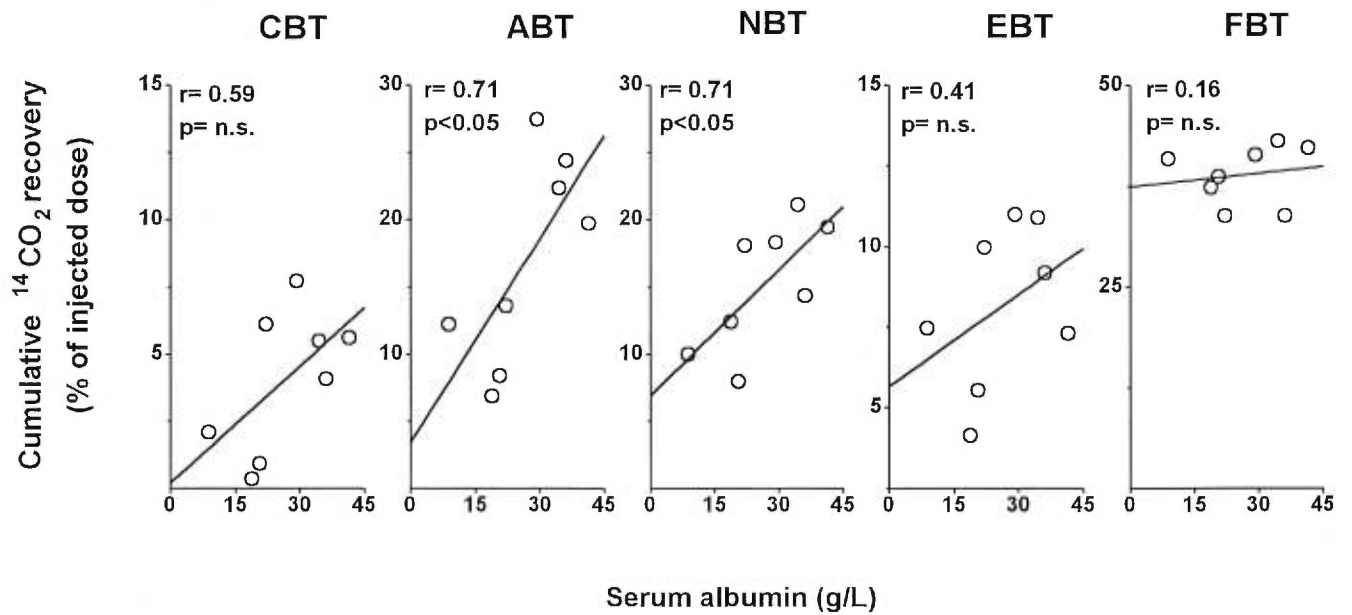


Figure 4: Correlation between the [¹⁴C] caffeine (CBT), aminopyrine (ABT), nitrosodimethylamine (NBT), erythromycin (EBT), and formaldehyde (FBT) breath test results and serum albumin concentration (g/L) in CCl₄-cirrhotic animals (O, n=8).

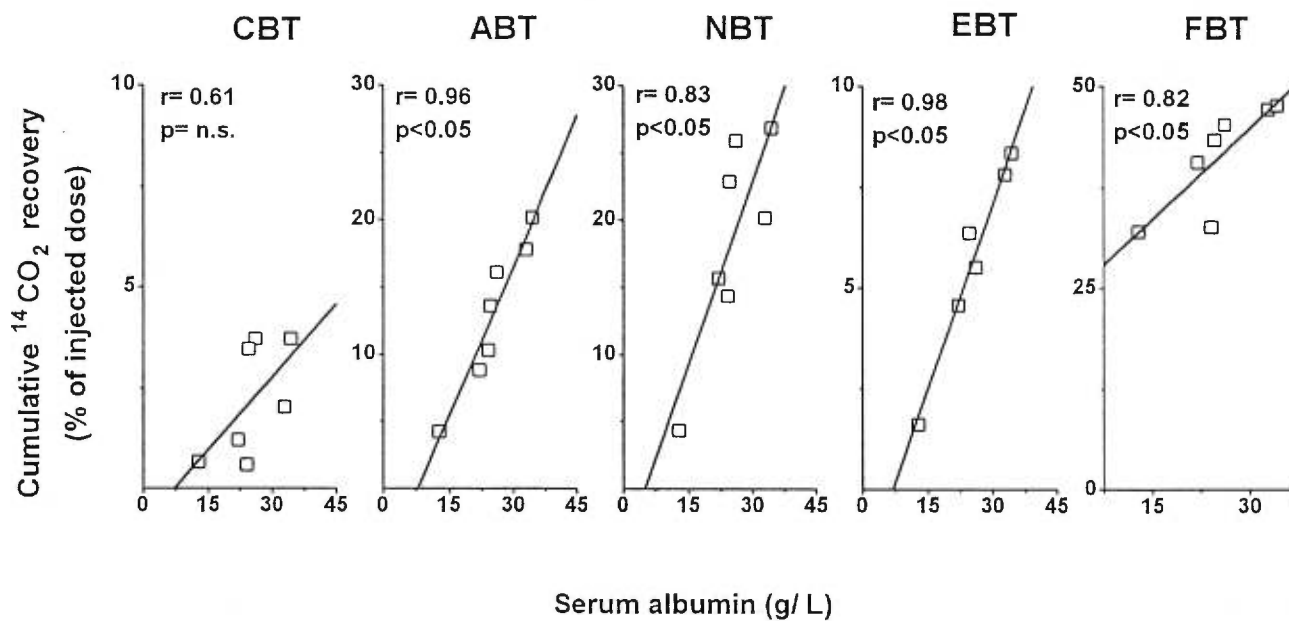


Figure 5: Correlation between the [¹⁴C] caffeine (CBT), aminopyrine (ABT), nitrosodimethylamine (NBT), erythromycin (EBT), and formaldehyde (FBT) breath test results and serum albumin concentration (g/L) in BDL-cirrhotic animals (□, n=7 except for EBT where n=6).

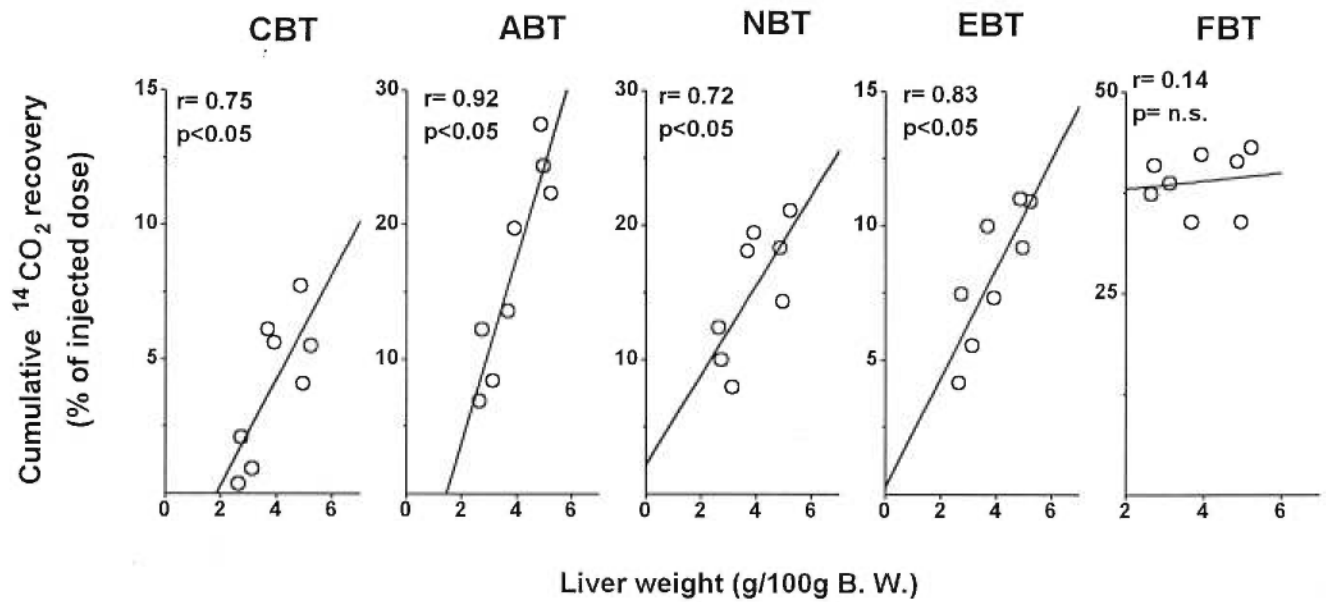


Figure 6: Correlation between the [¹⁴C] caffeine (CBT), aminopyrine (ABT), nitrosodimethylamine (NBT), erythromycin (EBT), and formaldehyde (FBT) breath test and liver weight (g liver/100 g body weight) in CCl₄-cirrhotic animals (O, n=8).

CHAPITRE IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

1-Discussion

Dans la première partie de cette étude, un test d'exhalaison utilisant la NDMA marqué au carbone 14 sur deux groupements méthyles a été mis au point pour mesurer l'activité du CYP2E1 *in vivo* chez le rat. Le test d'exhalaison à la NDMA s'ajoute à l'arsenal des tests déjà existants. C'est un outil expérimental d'autant plus intéressant lorsque qu'on considère le rôle majeur de ce P450 dans l'activation de certaines substances en agents cytotoxiques chez l'homme et chez le rat. (Lindros et al, 1990; Yang et al, 1990). Le CYP2E1 est un des isoenzymes du P450 dont l'expression de l'ARN messager et de la protéine est hautement variable chez l'homme (Carrière et al, 1996). Une relation positive entre le taux de CYP1A1 lymphocytaire et le risque de développer un cancer du poumon a été démontrée (Gahmberg et al, 1979; Kouri et al, 1982). L'existence d'une relation semblable entre l'expression génique du CYP2E1 et la susceptibilité à l'hépatotoxicité suite à l'exposition à des agents qui sont activés par cette isoenzyme a été proposée (Carrière et al, 1996). Jusqu'à récemment, l'activité du CYP2E1 était difficile à mesurer *in vivo* puisque plusieurs des substrats de cette enzyme sont des substances organiques toxiques. L'hydroxylation du chlorzoxazone a été proposée comme sonde pour déterminer l'activité du CYP2E1 chez l'homme (Peter et al, 1990), mais des études récentes suggèrent que les CYP1A2 et CYP3A4 sont également impliqués dans cette réaction (Ono et al, 1995; Yamazaki et al, 1995). Chez les animaux de laboratoire, le test d'exhalaison à la NDMA permettra d'explorer le rôle du CYP2E1 dans le métabolisme, l'induction, l'inhibition et l'activation des xénobiotiques *in vivo*.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons démontré que l'activité des P450s est diminuée de façon sélective dans le modèle de cirrhose biliaire. Nos résultats diffèrent cependant de ceux de George et al (1995). Ils avaient observé chez l'homme que l'activité enzymatique du CYP2E1 était réduite tandis que celle du CYP3A était normale dans les maladies du foie avec cholestase. Dans le modèle de cirrhose biliaire utilisé dans notre étude, l'activité du CYP2E1 est restée comparable aux animaux témoins tandis qu'elle était diminuée pour le CYP3A2. Les résultats divergents rapportés entre ces études chez l'homme et le rat suggèrent que l'expression des P450s dans la cirrhose peut varier selon l'espèce. Cependant, l'extrapolation des résultats entre les animaux et les humains est limitée; même si les enzymes hépatiques du P450 de l'homme et du rat partagent plusieurs ressemblances structurales et fonctionnelles, contrairement aux animaux de laboratoire, la population humaine démontre beaucoup plus de diversité du point de vue génétique et environnemental. D'autre part, il est possible que la divergence entre les résultats rapportés puisse être reliée à la nature du traitement expérimental utilisé pour produire la cirrhose chez le rat. Des études plus poussées seront nécessaires pour expliquer ces résultats contradictoires.

L'observation qu'aucun des tests d'exhalaison n'est diminué de façon significative chez les rats traités au CCl₄ est inattendue en raison des résultats rapportés dans d'autres études. Chez des rats avec une cirrhose induite par le CCl₄, Roos et al (1991) et Buters et al (1993) ont démontré une diminution de la clairance de l'aminopyrine tandis que Murray et al (1987) ont rapporté une réduction de l'activité microsomale des CYP2C11 et CYP3A2. Nous avons par contre observé une diminution des résultats des tests

d'exhalaison à l'aminopyrine, à la caféine et à l'érythromycine chez les rats cirrhotiques ayant un foie de petit poids par rapport à leur poids corporels. Bien que non significative, cette diminution semble suggérer que chez les animaux ayant une cirrhose sévère, les enzymes du cytochrome P450 ont tendance à être affectées de façon comparable indépendamment de l'étiologie de la cirrhose.

En dépit de l'uniformité histologique de la sévérité de la cirrhose produite par le traitement au CCl₄, nous avons noté une large variation dans les résultats des tests d'exhalaison. Ce modèle expérimental de cirrhose micronodulaire est représentatif des changements morphologiques et fonctionnels observés dans la cirrhose chez l'homme. Il existe également une importante variation de la fonction hépatique des patients cirrhotiques, d'où l'intérêt de développer des tests quantitatifs qui pourraient mesurer la réserve fonctionnelle de façon précise. Un des buts à long terme des études sur les tests d'exhalaison est le développement de tests pouvant quantifier la réserve fonctionnelle du foie chez les patients cirrhotiques. En déterminant quels cytochromes P450 sont les plus susceptibles d'être modifiés dans les maladies hépatiques, alors la mesure du changement au niveau de l'activité de ces P450s pourrait être utilisée pour déterminer la sévérité de l'atteinte hépatique.

Les mécanismes responsables de l'expression différentielle des P450s dans la cirrhose ne sont pas connus. Néanmoins, il n'est pas surprenant que les maladies hépatiques affectent les isoenzymes du cytochrome P450 différemment puisque ceux-ci ne possèdent pas tous le même mécanisme de régulation. La réduction de l'activité des CYP1A2, CYP2C11 et

CYP3A2 observée dans la cirrhose pourrait être le résultat d'une différence dans le mécanisme de régulation des P450s ou d'une sensibilité accrue de certains P450s aux effets de la cirrhose. Il est peu probable que ces différences soient dues à la distribution zonale des P450s dans le foie puisque les quatre enzymes étudiées sont distribuées de façon comparable dans l'acinus (Lindros et al, 1997).

La réduction du test d'exhalaison à la caféine chez les rats avec une cirrhose biliaire était plus importante que pour les tests d'exhalaison à l'aminopyrine et à l'érythromycine. Le CYP1A2 semble donc être le cytochrome dont l'activité est la plus sévèrement affectée dans la cirrhose. Des études futures quantifiant le niveau des protéines microsomales de cette enzyme seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Le CYP1A est induit par la fumée de cigarette (Conney et al, 1986). La cigarette est une substance fréquemment consommées par l'homme. Si le CYP1A2 s'avère être le P450 étant diminué de façon la plus précoce dans la cirrhose, il sera nécessaire de déterminer l'effet d'agents inducteurs du CYP1A2 sur la clairance de la caféine dans les maladies hépatiques.

Babany et al (1985) ont étudié l'effet de la cirrhose sur le contenu en P450s des tissus extra-hépatiques. Ils ont rapporté une légère élévation du contenu pulmonaire et une augmentation significative des P450s rénaux chez des rats avec une cirrhose biliaire tandis que le contenu hépatique, pulmonaire et rénal était inchangé dans la cirrhose post-nécrotique induite par le CCl₄. Une des limitations des tests d'exhalaison est l'impossibilité d'évaluer la contribution des P450s extra-hépatiques dans le métabolisme des sondes médicamenteuses utilisées. Cette contribution risque pourtant d'être importante pour

certains P450s, surtout en vue du mode d'administration intraveineux utilisé. Le métabolisme d'une partie de la dose intraveineuse dans les tissus extra-hépatiques fausserait les résultats des tests d'exhalaison en causant une surestimation de la réserve microsomale hépatique. Chez les animaux normaux et non-induits, la contribution des enzymes extra-hépatiques dans le métabolisme de ces substrats devrait être minimale. Par contre, l'effet de l'induction des P450s extra-hépatiques par des substances exogènes sur les résultats des tests d'exhalaison n'est pas connu. Les CYP1A2, CYP2C11 et CYP3A2 ne sont pas exprimés ou inductible de façon significative dans les tissus extra-hépatiques (Debri et al, 1995; Gonzalez et al, 1989; Yoshioka et al, 1987). Par contre, le CYP2E1 est présent dans les poumons et les reins et une induction de cette isoenzyme serait possible. Par conséquent, il serait important de démontrer une corrélation entre le niveau des isoformes hépatiques et de leur activité déterminée *in vivo* par les test d'exhalaison.

2-Conclusion

Bien que la NDMA ne puisse être utilisé chez l'homme à cause de ses propriétés cancérogènes, cette substance s'avère être un outil expérimental utile chez le rat. L'utilisation du test d'exhalaison à la NDMA permettra de mesurer les changements au niveau de l'activité catalytique du CYP2E1 *in vivo* chez le rat dans différentes conditions expérimentales.

Nous avons déterminé que l'activité catalytique des isoenzymes du P450 n'est pas diminuée de façon uniforme dans la cirrhose chez le rat. Des études plus approfondies devront être faites pour vérifier l'hypothèse que les mêmes P450s ont tendance à être diminués dans les cas de cirrhose sévère, indépendamment de l'étiologie de la maladie.

Implications cliniques

L'identification des P450s qui sont préférentiellement diminués dans la cirrhose permettra d'évaluer la fonction hépatique en utilisant des sondes médicamenteuses spécifiques pour les isoenzymes affectées. Par ailleurs, une connaissance plus approfondie des changements de l'activité catalytique des P450s dans les maladies hépatiques permettrait des alternatives thérapeutiques plus sécuritaires par l'utilisation de médicaments non métabolisés par les P450s affectés.

Études futures

Pour faire suite à notre étude, il serait pertinent d'étudier l'activité des P450s dans d'autres modèles expérimentaux de cirrhose pour déterminer si le profil de changement des P450s est comparable à celui qui a été observé dans cette étude. L'administration de CCl₄ cause le développement d'une cirrhose micronodulaire irréversible chez le rat, mais le taux de succès de ce protocole expérimental est hautement variable et il est difficile de prédire le pourcentage des animaux qui développeront une atteinte hépatique sévère à la fin du traitement. Un modèle de cirrhose qu'il sera intéressant d'étudier est la cirrhose micronodulaire induite par le thioacétamide (Müller et al, 1988; Okanoué et al, 1995). L'avantage de ce modèle animal est que le taux de mortalité est très faible et qu'approximativement 100% des animaux développent des lésions hépatiques, plus uniformes et de degré plus sévère que celles obtenues chez les rats CCl₄.

Il sera aussi important de déterminer si les changements dans l'activité des enzymes hépatiques observés *in vivo* chez les animaux cirrhotiques correspondent à des changements proportionnels au niveau des protéines en quantifiant les enzymes individuelles par des méthodes biochimiques d'immunobuvardage avec des anticorps monoclonaux ou polyclonaux qui reconnaissent chaque isoenzyme. En plus, il sera intéressant d'explorer quels sont les changements causés par la cirrhose au niveau de l'ARN messager en utilisant des méthodes de biologie moléculaire.

BIBLIOGRAPHIE

Andreason P. B., Ranek L., Statland B. E., Tygstrup N. 1974. Clearance of antipyrine-dependence of quantitative liver function. *Eur J Clin Invest*, 4: 129-134.

Babany G, Descatoire V, Corbic M, Gendre S, Degott C, Larrey D, Letteron P, Wandscheer JC, Funck-Brentano C, and Pessayre D. Regulation of renal cytochrome P-450. 1985. Effect of two-thirds hepatectomy, cholestasis, biliary cirrhosis, and post-necrotic cirrhosis on hepatic and renal microsomal enzymes. *Biochem Pharmacol*, 34: 311-320.

Berthou F., Guillois B., Riche C., Dreano Y., Jacqz-Aigrain E., Beaune P.H. 1992. Interspecies variations in caffeine metabolism related to cytochrome P4501A enzymes. *Xenobiotica*, 22: 671-680.

Bircher J., Blankart R., Halpern A., Haecki W., Laissue J., Preisig R. 1973. Criteria for assessment of functional impairment in patients with cirrhosis of the liver. *Eur J Clin Invest*, 3: 72-85.

Brady, J. F., Ishizaki, H., Fukuto, J. M., Lin, M. C., Fadel, A., Gapac, J. M., and Yang, C. S. 1991a. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* 4: 642-647.

Branch R. A., Herbert C. M., Read A. E. 1973. Determinants of serum antipyrine half-lives in patients with liver disease. *Gut*, 14: 569-573.

Buters J. T. M., Zysset T., Reichen J. 1993. Metabolism of antipyrine *in vivo* in two rat models of liver cirrhosis. *Biochem Pharmacol*, 46: 983-991.

Carlisle R., Galambos J. T., Warren W. D. 1979. The relationship between conventional liver tests, quantitative function tests, and histopathology in cirrhosis. *Digest Dis Sci*, 24: 358-362.

Carrière V., Berthou F., Baird S., Belloc C., Beaune P., de Waziers I. 1996. Human cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): from genotype to phenotype. *Pharmacogenetics*, 6: 203-211.

Child III C. G., Turcotte J. G. 1964. Surgery and portal hypertension. In: Child III C.G., ed. *The liver and portal hypertension*. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 50.

Conney A. H. Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes: the first Bernard B. Brodie lecture at Pennsylvania State University. 1986. *Life Sci*, 39: 2493-2518.

Debri K., Boobis A. R., Davies D. S., Edwards R. J. 1995. Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues. *Biochem Pharmacol*, 50: 2047-2056.

Ekindjian O. G., Devanlay M., Duchassaing D., Leluan G., Kammerer J., Fouet P., Auget J. L., Maccario J. 1981. Multivariate analysis of clinical and biological data in cirrhotic patients: application to prognosis. *Eur J Clin Invest*, 11: 213-220.

Ekström, G., and Ingelman-Sundberg, M. 1989. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-45011E1). *Biochem. Pharmacol.* 38: 1313-1319.

Farrell GC, Cooksley WGE, and Powell LW. 1979. Drug metabolism in liver disease: activity of hepatic microsomal metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther*, 26: 483-492.

Fuhr U., Doehmer J., Battula N., Wölfel C., Kudla C., Keita Y., Staib A. H. 1992. Biotransformation of caffeine and theophylline in mammalian cell lines genetically engineered for expression of single cytochrome P450 isoforms. *Biochem Pharmacol*, 43: 225-235.

Gahmberg C. G., Sekki A., Kosunen T. U., Holsti L. R., Mäkelä O. 1979. Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity and pulmonary carcinoma. *Int J Cancer*, 23: 302-305.

Gall J. A. M., Bhathal P. S. 1990. A quantitative analysis of the liver following ligation of the common bile duct. *Liver*, 10: 116-125.

Gascon-Barré M., Huet P. M., Belgiorno J., Plourde V., Coulombe P. A. 1989. Estimation of collagen content of the liver specimens. Variation among animals and among hepatic lobes in cirrhotic rats. *J Histochem Cytochem*, 37: 377-381.

George J., Murray M., Byth K., Farrell G. C. 1995. Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology*, 21: 120-128.

Gibson G. G., Skett P. (Éds). 1994. Introduction to drug metabolism, 2nd ed., Blackie Academic & Professional, London. pp. 1-34.

Gonzalez F. J. 1989. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev*, 40: 243-288.

Gross J. B. Jr., Reichen J., Zeltner T. B., Zimmermann A. 1987. The evolution of changes in quantitative liver function tests in a rat model of biliary cirrhosis: correlation with morphometric measurement of hepatocyte mass. *Hepatology*, 7: 457-463.

Hayes K. A., Brennan B., Chenery R., Houston J. B. 1995. *In vivo* disposition of caffeine predicted from hepatic microsomal and hepatocyte data. *Drug metab Disp*, 23: 349-353.

Heath D. F. 1962. The decomposition and toxicity of dialkylnitrosamines in rats. *Biochem J*, 85: 72-90.

Hepner G. W., Vesell E. S. 1975. Quantitative assessment of hepatic function by breath analysis after oral administration of [¹⁴C] aminopyrine. *Ann Intern Med*, 83: 632-638.

Ichikawa Y., Mason H. S. 1973. Distribution of cytochrome P-450 and related redox systems among hepatocyte membranes. *Dans: Oxidases and related redox systems*. 1973. Proceedings of the second international symposium on oxidases and related redox systems. Volume 2. T. E. King, H. S. Mason, M. Morrison (Éds). University Park Press, Baltimore. pp: 605-625.

Imaoka S., Inoue K., Fundae Y. 1988. Aminopyrine metabolism by multiple forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes: simultaneous quantification of four aminopyrine metabolites by high-performance liquid chromatography. *Arch Biochem Biophys*, 265: 159-170.

Jungermann K., Katz N. 1982. Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology*, 2: 385-395.

Kato R., Yamazoe Y. 1992. Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex- and species-related differences in drug toxicity. *Toxicology lett*, 64/65: 661-667.

Kimura S., Gonzalez F. J., Nebert D. W. 1986. Tissue-specific expression of the mouse dioxin-inducible P₁450 and P₃450 genes: differential transcriptional activation and mRNA stability in liver and extrahepatic tissues. *Mol Cell Biol*, 6: 1471-1477.

Kotake A. N., Schreider B. D., Latts J. R. 1982. The *in vivo* measurement of expired ¹⁴CO₂ derived from the N-demethylation of aminopyrine as a reflection of the *in vitro* hepatic cytochrome P-450 drug-metabolism activity in rats. *Drug Metab Disp*, 10: 251-258.

Kouri R. E., McKinney C. E., Slomiany D. J., Snodgrass D. R., Wray N. P., McLemore T. L. 1982. Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes. *Cancer Res*, 42: 5030-5037.

Lauterburg B. H., Bircher J. 1976. Expiratory measurements of maximal aminopyrine demethylation *in vivo*: effect of phenobarbital, partial hepatectomy, portocaval shunt, and bile duct ligation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 196: 501-509.

Lindros K. O., Cai Y., Penttilä K. E. 1990. Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 IIEI in carbon tetrachloride-induced damage to centrilobular hepatocytes from ethanol-treated rats. *Hepatology*, 12: 1092-1097.

Lindros K. O. 1997. Zonation of cytochrome P450 expression, drug metabolism and toxicity in liver. *Gen Pharmac*, 28: 191-196.

Matsumoto T., Emi Y., Kawabata S. I., Omura T. 1986. Purification and characterization of three male-specific and one female-specific forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes. *J Biochem*, 100: 1359-1371.

Milstein H. J., Bloomer J. R., Klatskin G. 1976. Serum bile acids in alcoholic liver disease. Comparison with histological features of the disease. *Digest Dis*, 21: 281-285.

Morimoto M., Hagbjörk A. L., Wan Y. J. Y., Fu P. C., Clot P., Albano E., Ingelman-Sundberg M., and French S. W. 1995. Modulation of experimental alcohol-induced liver disease by cytochrome P450 2E1 inhibitors. *Hepatology*, 21: 1610-1617.

Müller A., Machnik F., Zimmermann T., Schubert H. 1988. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats- usefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol*, 34: 229-236.

Murray M., Zaluzny L., Farrell G. C. 1986. Drug metabolism in cirrhosis. Selective changes in cytochrome P-450 isozymes in the choline-deficient rat model. *Biochem Pharmacol*, 35: 1817-1824.

Murray M., Zaluzny L., Farrell G. C. 1987. Impaired androgen 16 α -hydroxylation in hepatic microsomes from carbon tetrachloride-cirrhotic male rats. *Gastroenterology*, 93: 141-147.

Nelson D. R. , Koymans L., Kamatami T., Stegeman J. J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C., Nebert D. W. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1-42.

Nelson D. R., Kamatami T., Waxman D. J., Guengerich F. P. , Estabrook R. W., Feyereisen R. , Gonzalez F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O., Okuda K., Nebert D. W. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*, 12: 1-51.

Ohara N., Schaffner T., Reichen J. 1993. Structure-function relationship in secondary biliary cirrhosis in the rat. Stereological and hemodynamic characterization of a model. *J Hepatol*, 17: 155-162.

Okanoue T., Mori T., Sakamoto S., Itoh Y. 1995. Role of sinusoidal endothelial cells in liver disease. *J Gastroen Hepatol*, 10: s35-s37.

Omura T., Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 293: 2370-2378.

Ono, S., Hatanaka, T., Hotta, H., Tsutsui, M., Satoh, T., and Gonzalez, F. J. 1995. Chlorzoxazone is metabolized by human CYP1A2 as well as by human CYP2E1. *Pharmacogenetics*, 5: 143-150.

Parke D. V. 1987. Activation mechanisms to chemical toxicity. *Arch Toxicol*, 60: 5-15.

Peter R., Böcker R., Beaune P. H., Iwasaki M., Guengerich F. P., Yang C. S. 1990. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem Res Toxicol*, 3: 566-573.

Plourde V., Gascon-Barré M., Coulombe P. A., Vallières S., Huet P. M. Hepatic handling of vitamin D₃ in micronodular cirrhosis: a structure-function study in the rat. 1988. *J Bone Miner Res*, 3: 461-471.

Porter T. D., Coon M. J. 1991. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem*, 266: 13469-13472.

Powis G., Jansson I. 1979. Stoichiometry of the mixed function oxidase. *Pharmac Ther*, 7: 297-311.

Proctor E., Chatamra K. 1982. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*, 83: 1183-1190.

Provencher S., Demers C., Bastien M. C., Villeneuve J. P., Gascon-Barré M. Cyclosporine A accelerates hepatic regeneration but only selectively improves the early recovery of drug metabolism in the partially hepatectomized rat. (Soumis pour publication)

Pugh R. N. H., Murray-Lyon I. M., Dawson J. L., Pietroni M. C., Williams R. 1973. Transection of the esophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*, 60: 646-649.

Quinn G. P., Axelrod J., Brodie B. B. 1958. Species, strain and sex differences in metabolism of hexobarbitone, amidopyrine, antypyrene and aniline. *Biochem Pharmacol*, 1: 152-159.

Reichen J., Arts B., Schafroth U., Zimmermann A., Zeltner Th. B., Zysset T. 1987. Aminopyrine *N*-demethylation by rats with liver cirrhosis. Evidence for the intact cell hypothesis. A morphometric-functional study. *Gastroenterology*, 93: 719-726.

Reichen J., Egger B., Ohara N., Zeltner T. B., Zysset T., Zimmermann A. 1988. Determinants of hepatic function in liver cirrhosis in the rat. Multivariate analysis. *J Clin Invest*, 82: 2069-2076.

Renner E., Wietholtz H., Huguenin P., Arnaud M. J., Preisig R. 1984. Caffeine: a model compound for measuring liver function. *Hepatology*, 4:38-46.

Ritland S., Skrede S., Blomhoff J. P., and Gjone E. 1973. Coagulation factors as indicators of protein synthesis in chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol*, 8: 113-117.

Roberts B. J., Shoaf S. E., Song B. J. 1995. Rapid changes in cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) activity and other P450 isozymes following ethanol withdrawal in rats. *Biochem Pharmacol*, 49 : 1665-1673.

Roos, F. J., Zysset, T., and Reichen, J. 1991. Differential effect of biliary and micronodular cirrhosis on oxidative drug metabolism. *In vitro-in vivo* correlations of dextromethorphan metabolism in rat models. *Biochem Pharmacol* 41: 1513-1519.

Rowland M., Benet L. Z., Graham G. G. 1973. Clearance concepts in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1: 123-136.

Ryan D. E., Koop D. R., Thomas P. E., Coon M. J., Levin W. 1986. Evidence that isoniazid and ethanol induce the same microsomal cytochrome P-450 in rat liver, an isozyme homologous to rabbit liver cytochrome P-450 isozyme 3a. *Arch Biochem Biophys*, 246: 633-644.

Saunders J. B., Walters J. R. F., Davies P., Paton A. 1981. A 20-year prospective study of cirrhosis. *Br Med J*, 282: 263-266.

Schaad H. J., Renner E., Wietholtz H., Arnaud M. J., Preisig R. 1995. Caffeine demethylation measured by breath test analysis in experimental liver injury in the rat. *J Hepatol*, 22: 82-87.

Schneider J. F., Baker A. L., Haines N. W., Hatfield G., Boyer J. L. 1980. Aminopyrine N-demethylation: a prognostic test of liver function in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, 79: 1145-1150.

Song B. J., Gelboin H. V., Park S. S., Yang C. S., Gonzalez F. J. 1986. Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme. *J Biol Chem*, 261: 16689-16697.

Song B. J., Matsunaga T., Hardwick J. P., Park S. S., Veech R. L., Yang C. S., Gelboin H. V., Gonzalez F. J. 1987. Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat. *Mol Endocrinol*, 1: 542-547.

Souček P., Gut I. 1992. Cytochrome P-450 in rats: structure, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica*, 22: 83-103.

Tassaneeyakul, W., Birkett, D.J., McManus, M.E., Tassaneeyakul W, Veronese ME, Andersson T, Tukey RH, and Miners JO. 1994. Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes P450: contribution of 1A2, 2E1 and 3A isoforms. *Biochem Pharmacol* 47: 1767-1776.

Thomas, P. E., Bandiera, S., Maines, S. L., Ryan, D. E., and Levin, W. 1987. Regulation of cytochrome P-450j, a high-affinity *N*-nitrosodimethylamine demethylase, in rat hepatic microsomes. *Biochemistry*, 26: 2280-2289.

Tu Y. Y., Yang C. S. 1985. Demethylation and denitrosation of nitrosamines by cytochrome P-450 isozymes. *Arch Biochem Biophys*, 242: 32-40.

Tygstrup N. 1964. The galactose elimination capacity in relation to clinical and laboratory findings in patients with cirrhosis. *Acta Med Scand*, 175: 291-300.

Tygstrup, N., Vilstrup, H. 1983. Functional evaluation of the hepatocyte. *Dans: Diagnostic procedures in the evaluation of hepatic diseases*. S. Beker, A. R. Liss (Éds), Inc., New York. pp: 17-41.

Villeneuve J. P., Infante-Rivard C., Ampelas M., Pomier-Layrargues G., Huet P. M., Marleau D. 1986. Prognostic value of the aminopyrine breath test in cirrhotic patients. *Hepatology*, 6: 928-931.

Watkins P. B., Murray S. A., Winkelman L. G., Heuman D. M., Wrighton S. A., Guzelian P. S. 1989. Erythromycine breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochrome P-450. Studies in rats and patients. *J Clin Invest*, 83: 688-697.

Waxman D. J., Dannan G. A., Guengerich F. P. 1985. Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. *Biochemistry*, 24: 4409-4417.

Winkel P., Juhl E., Tygsrup N., the Copenhagen study group for liver diseases. 1970. The prognostic value of clinical and laboratory data in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol*, 5: 181-187.

Wood, A. J. J., Villeneuve, J. P., Branch, R. A., Rogers, L. W., and Shand, D. G. 1979. Intact hepatocyte theory of impaired drug metabolism in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*, 76: 1358-1362.

Wrighton S. A., Stevens J. C. 1992. The human hepatic cytochrome P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol*, 22: 1-21.

Wu D., Cederbaum A. I. 1992. Presence of functionally active cytochrome P-450III_{E1} in the plasma membrane of rat hepatocytes. *Hepatology*, 15: 515-524.

Wu Z., Piché D., Vallières S., Huet P. M., Gascon-Barré M. 1991. Unimpaired induction of drug-metabolizing enzymes in hepatocytes isolated from rats with micronodular cirrhosis. *Can J Physiol Pharm*, 69: 426-436.

Yamazaki, H., Guo, Z., and Guengerich, F. P. 1995. Selectivity of cytochrome P4502E1 in chlorzoxazone 6-hydroxylation. *Drug Metab. Dispos.* 23: 438-440.

Yang, C. S., Yoo, J. S. H., Ishizaki, H., and Hong, J. 1990. Cytochrome P45011E1: Roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab. Rev.* 22: 147-159.

Yoshioka H., Morohashi K. I., Sogawa K., Miyata T., Kawajiri K., Hirose T., Inayama S., Fujii-Kuriyama Y., Omura T. 1987. Structural analysis and specific expression of microsomal cytochrome P-450(M-1) mRNA in male rat livers. *J Biol Chem*, 262: 1706-1711.

Zimmerman H. J. 1983. Hepatotoxic evaluation methodology. *Dans: Diagnostic procedures in the evaluation of hepatic diseases.* S. Beker, A. R. Liss (Éds), Inc., N. Y., pp: 159-194.

