

2m11.2965.8

Université de Montréal

Prévention des répercussions de la réaction inflammatoire sur le cytochrome

P450 avec le 21-aminostéroïde U74389G : mécanismes d'action

Par

Mehrzaad Taherzadeh

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 2001

©Mehrzaad Taherzadeh, 2001



W

4

U58

2002

V.062



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Prévention des répercussions de la réaction inflammatoire sur le cytochrome P450

avec le 21-aminostéroïde U74389G : mécanismes d'action

présenté par:

Mehrzaad Taherzadeh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Chantal Lambert, Président rapporteur  
Patrick du Souich, Directeur de recherche  
Ibrahim Yousef, Membre du jury

Mémoire accepté le: \_\_\_\_\_

## Résumé

Chez l'homme, les infections bactériennes et virales, de même qu'une immuno-stimulation induite par certains vaccins (antigrippal, BCG), diminuent la clairance de médicaments tels que l'antipyrine et la théophylline, secondairement à la réduction de l'activité des isoformes du cytochrome P450 hépatique. Chez l'animal *in vivo*, il a été rapporté que 48 heures après la production d'une réaction inflammatoire aiguë (RIA) par l'injection s.c. de térébenthine, l'inflammation diminue la vitesse de la biotransformation de la théophylline. De plus, *in vitro*, le sérum d'animaux avec une RIA ( $S_{INFLA}$ ) réduit la quantité et l'activité du P450 et accroît la peroxydation lipidique dans les hépatocytes de lapins avec une RIA ( $H_{INFLA}$ ). *In vivo*, l'administration i.v. du 21-aminostéroïde U74389G prévient totalement la répression du cytochrome P450 hépatique et l'augmentation de la peroxydation hépatique provoquées par la RIA.

L'objectif de ce projet était d'étudier les mécanismes sous-jacents à la prévention par l'aminostéroïde U74389G de la diminution de l'expression et de l'activité de certaines isoformes du cytochrome P450 lors d'une RIA.

Le protocole expérimental incluait 4 groupes de lapins, le premier groupe était le groupe témoin. Le deuxième groupe de lapins a reçu 3 mg/kg du U74389G par voie intraveineuse chaque 12 heures sur une période de 72 heures. Le troisième groupe de lapins a reçu de la térébenthine pour déclencher une RIA. Finalement, le quatrième groupe de lapins a reçu de la térébenthine et en même temps du U74389G chaque 12 heures pendant 72 heures. Le foie des lapins a été isolé 48 heures après l'induction de la réaction inflammatoire. *In vitro*, les  $H_{INFLA}$  ont été incubés avec le sérum des lapins

des quatre groupes précédents en présence et en absence du U74389G et nous avons évalué l'effet de ces conditions expérimentales sur l'activité et la quantité de plusieurs isoformes du cytochrome P450 et la peroxydation des lipides.

Les résultats montrent que *in vivo*, la RIA diminue l'activité et l'expression des isoformes CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6. Cependant, lorsque les lapins reçoivent le U74389G, l'activité et la quantité des isoformes 1A1 et 1A2 ne sont pas modifiées par la RIA tandis que la quantité de CYP3A6 est augmentée significativement. *In vitro*, l'incubation de S<sub>INFLA</sub> avec des H<sub>INFLA</sub> pendant 4 ou 24 h produit une baisse d'activité des CYP1A1 et 1A2 sans modification de leurs expressions. Toutefois, lorsque le S<sub>INFLA</sub> provient de lapins ayant reçu du U74389G, l'incubation avec des H<sub>INFLA</sub> pendant 4 ou 24 h ne diminue pas l'activité de CYP1A1 et 1A2. De même, lorsque du S<sub>INFLA</sub> est incubé pendant 4 ou 24 h avec les H<sub>INFLA</sub> de lapins ayant reçu du U74389G, l'activité des CYP1A1 et 1A2 n'est pas diminuée.

*In vivo*, la RIA augmente la peroxydation des lipides intrahépatiques et l'administration du U74389G prévient l'augmentation de MDA induite par la RIA. *In vitro*, le S<sub>INFLA</sub> a augmenté la peroxydation des lipides dans les H<sub>CONT</sub> et dans les H<sub>INFLA</sub>; toutefois, cette hausse de peroxydation était totalement absente lorsque le S<sub>INFLA</sub> provenait de lapins ayant reçu du U74389G. Par ailleurs, le S<sub>INFLA</sub> n'a pas augmenté la concentration de MDA dans les H<sub>CONT</sub> de lapins prétraités avec le U74389G; cependant, le S<sub>INFLA</sub> a augmenté la concentration de MDA dans des H<sub>INFLA</sub> d'animaux ayant reçu du U74389G, mais lorsque le S<sub>INFLA</sub> provenait de lapins ayant

reçu du U74389G, la concentration de MDA n'a pas augmenté dans le  $H_{INFLA}$  de lapins traités avec le U74389G.

En conclusion, les résultats de cette étude démontrent que le prétraitement des lapins avec du U74389G prévient l'inactivation et la répression du P450 hépatique par un mécanisme mixte: il inhibe la production de médiateurs sériques pro-inflammatoires et il exerce un effet protecteur dans les hépatocytes en interférant avec les voies de signalisations intracellulaires menant à l'inactivation/répression du P450. Enfin, nos résultats indiquent que le U74389G est un inducteur puissant du CYP3A6 hépatique.

MOTS CLÉS : INFLAMMATION, U74389G, 21-AMINOSTÉROÏDE, CYTOCHROME P450, LAPIN.

## Résumé

In the rabbit, the 21-aminosteroid U74389G prevents cytochrome P450 (P450) down-regulation produced by a turpentine-induced acute inflammatory reaction (TIAR). To investigate the mechanism of action of U74389G, rabbits were segregated in four experimental groups, controls, rabbits receiving U74389G (3 mg/kg i.v. every 12 h, for 72 h), and the last two groups with TIAR (5 ml s.c.) without or with U74389G (3 mg/kg i.v. every 12 h, for 72 h). Hepatocytes were isolated 48 h later and incubated for 4 or 24 h with the serum of the rabbits. The amount and activity of CYP1A1, CYP1A2 and 3A6, and lipid peroxidation were estimated. TIAR diminished ( $p < 0.05$ ) the metabolism of theophylline because of a reduction in CYP1A1 and 1A2 amounts, and malondialdehyde (MDA) was increased ( $p < 0.05$ ). U74389G prevented the increase in MDA as well as the decrease in CYP1A1 and 1A2 amounts and activity, and increased CYP3A6 expression by 40%. Compared with serum from control rabbits ( $RS_{CONT}$ ), incubation of serum from rabbits with TIAR ( $RS_{INFLA}$ ) for 4 h with hepatocytes from rabbits with TIAR ( $H_{INFLA}$ ) reduced the output of theophylline metabolites by approximately 25% ( $p < 0.05$ ) and increased MDA. Although, the serum from rabbits treated with U74389G ( $RS_{INFLA+U74389G}$ ) when incubated with  $H_{INFLA}$  failed to reduce theophylline metabolism or to increase MDA. Moreover, in  $H_{INFLA+U74389G}$ ,  $RS_{INFLA}$  did not decrease theophylline metabolites but increased MDA. In conclusion, U74389G prevents TIAR P450 down-regulation and decrease in activity by hindering the release of serum mediators and by averting intracellular events rather than acting as an antioxidant.

**Key words:** cytochrome P450, aminosteroid U74389G, down-regulation, inflammation, turpentine, hepatocytes, rabbits.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
RÉSUMÉ.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
<b>Introduction.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Généralités sur la biotransformation des médicaments.....</b>	<b>4</b>
1.1. Sites de biotransformation des médicaments.....	5
1.2. Réactions de phase I et réactions de phase II.....	5
1.3. Cytochrome P450.....	6
1.4. Facteurs influençant le métabolisme des médicaments.....	8
1.4.1. Conditions pathologiques et le cytochrome P450.....	10
1.5. Inhibition et induction des isoformes du P450.....	13
<b>2. Réaction inflammatoire et P450.....</b>	<b>16</b>
2.1. L'inflammation et le cytochrome P450.....	18
2.2. Rôles des cytokines dans la régulation du P450 hépatique.....	19
2.3. Mécanismes de modulation des cytochromes P450 par les cytokines.....	23
2.3.1. Voies de signalisation menant à l'inactivation/répression du P450.....	24
2.3.2. Les second messagers impliqués dans l'inactivation/ répression du P450.....	26
2.3.2.1. Les substances oxygénées réactives et l'inflammation.....	26
2.3.2.2. Les sphingolipides.....	29
2.3.2.3. Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique.....	30
2.4. La réaction inflammatoire locale induite par l'injection de térébenthine.....	32

<b>3. Les 21-aminostéroïdes</b>	
3.1. Historique de l'usage des 21-aminostéroïdes.....	36
3.2. Mécanismes d'action des 21-aminostéroïdes.....	38
<b>4. L'objectif de l'étude.....</b>	<b>39</b>
<b>PRÉSENTATION DU MANUSCRIT.....</b>	<b>42</b>
<b>THE AMINOSTEROID U74389G PREVENTS THE INFLAMMATION-INDUCED DOWN-REGULATION OF CYP1A1 AND 1A2 BUT NOT THE DEPRESSION OF CYP3A6 IN THE RABBIT.....</b>	<b>43</b>
INTRODUCTION.....	45
MATERIAL AND METHODS.....	48
Experimental protocol.....	48
<i>In vitro</i> studies.....	50
Drugs and chemicals.....	51
Statistical analysis.....	52
RESULTS.....	53
Effect of U74389G <i>in vivo</i> on the activity and expression of CYP1A1, 1A2 and 3A6.....	53
Effect of U74389G on the serum mediators responsible for the reduction in P450 activity.....	54
Effect of U74389G on the modulation of hepatic P450 activity.....	55
DISCUSSION.....	64
ACKNOWLEDGMENTS.....	69
REFERENCES.....	70
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>81</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>100</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>120</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I:	Facteurs influençant l'activité et la quantité des isoformes du cytochrome P450.....	9
Tableau II:	L'effet du 21-aminostéroïde U74389G sur la biotransformation de la théophylline en 3-méthylxanthine (3MX), acide 1-méthylurique (1MU) et acide 1,3-diméthylurique (1,3DMU) et sur la peroxydation lipidique dans les hépatocytes de lapins témoins ou de lapins avec une RIA recevant ou non le U74389G et incubés pendant 24 h avec le sérum de lapins témoins ou de lapins avec une RIA recevant ou non le U74389G.....	64

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1: Structures chimiques du méthylprednisolone et des 21-aminostéroïdes U74006F et U74389G..... 37
- Figure 2: Schéma de la biotransformation de la théophylline chez l'humain adulte et des isoformes du cytochrome P450 qui sont impliqués dans la formation de ses métabolites.....40
- Figure 3: L'effet du 21-aminostéroïde U74389G sur la production des métabolites de la théophylline, le 3-méthylxanthine (3MX), l'acide 1-méthylurique et l'acide 1,3-diméthylurique (1,3DMU) lorsque les hépatocytes de lapins témoins ( $H_{CONT}$ ) et de lapins avec une RIA ( $H_{INFLA}$ ) prétraités ou non avec le U74389G sont incubés pendant une période de 4 h avec le sérum de lapins témoins ( $S_{CONT}$ )..... 57
- Figure 4: La quantité des apoprotéines CYP1A1, 1A2 et 3A6 dans les hépatocytes de lapins témoins ( $H_{CONT}$ ), de lapins avec une RIA ( $H_{RIA}$ ) et de lapins avec une RIA ayant reçu le U74389G pendant 72 h ( $H_{INFLA+U74389G}$ ).....58
- Figure 5: L'effet du 21-aminostéroïde U74389G sur la production des métabolites de la théophylline, le 3-méthylxanthine (3MX), l'acide 1-méthylurique et l'acide 1,3-diméthylurique (1,3DMU) lorsque les hépatocytes de lapins témoins ( $H_{CONT}$ ) sont incubés pendant une période de 4 h avec le sérum de lapins témoins ( $S_{CONT}$ ) et le sérum de lapins avec une RIA ( $S_{INFLA}$ ) prétraités ou non avec le U74389G.....59
- Figure 6: L'effet du 21-aminostéroïde U74389G sur la production des métabolites de la théophylline, le 3-méthylxanthine (3MX), l'acide 1-méthylurique et l'acide 1,3-diméthylurique (1,3DMU) lorsque les hépatocytes de lapins avec une RIA ( $H_{INFLA}$ ) sont incubés pendant une période de 4 h avec le sérum de lapins témoins ( $S_{CONT}$ ) et le sérum de lapins avec une RIA ( $S_{INFLA}$ ) prétraités ou non avec le U74389G.....60
- Figure 7: L'effet du 21-aminostéroïde U74389G sur la peroxydation des lipides hépatique estimée par la formation du malondialdéhyde lorsque les hépatocytes de lapins avec une RIA ( $H_{INFLA}$ ) sont incubés pendant une période de 4 h avec le sérum de lapins témoins ( $S_{CONT}$ ) et le sérum de lapins avec une RIA ( $S_{INFLA}$ ) prétraités ou non avec le U74389G..... 61

- Figure 8: L'effet du 21-aminostéroïde U74389G sur la production des métabolites de la théophylline, le 3-méthylxanthine (3MX), l'acide 1-méthylurique et l'acide 1,3-diméthylurique (1,3DMU) lorsque les hépatocytes de lapins témoins prétraités avec le U74389G ( $H_{\text{CONT}+U74389G}$ ) sont incubés pendant une période de 4 h avec le sérum de lapins témoins ( $S_{\text{CONT}}$ ) et le sérum de lapins avec une RIA ( $S_{\text{INFLA}}$ ) prétraités ou non avec le U74389G.....62
- Figure 9: L'effet du 21-aminostéroïde U74389G sur la production des métabolites de la théophylline, le 3-méthylxanthine (3MX), l'acide 1-méthylurique et l'acide 1,3-diméthylurique (1,3DMU) lorsque les hépatocytes de lapins avec une RIA et prétraités avec le U74389G ( $H_{\text{INFLA}+U74389G}$ ) pendant une période de 4 h avec le sérum de lapins témoins ( $S_{\text{CONT}}$ ) et le sérum de lapins avec une RIA ( $S_{\text{INFLA}}$ ) prétraités ou non avec le U74389G.....63

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AP-1:	Activator protein-1
21-AS:	21-Aminostéroïdes
ARNT:	Aromatic receptor nuclear translocator
BCG:	Vaccin bilié de Calmette et Guérin
C(3a,5a):	Complément (3a,5a)
CO:	Monoxyde de carbone
1,3-DMU:	Acide 1,3-diméthylurique
HAP:	Hydrocarbure aromatique polycyclique
H <sub>CONT</sub> :	Hépatocyte de lapin témoin (ou contrôle)
H <sub>CONT+U74389G</sub> :	Hépatocyte de lapin témoin recevant le U74389G
H <sub>INFLA</sub> :	Hépatocyte de lapin avec une réaction inflammatoire aiguë
H <sub>INFLA+U74389G</sub> :	Hépatocyte de lapin avec une réaction inflammatoire aiguë et recevant le U74389G
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peroxyde d'hydrogène
HNF4:	Facteur nucléaire d'hépatocyte 4
IFN-( $\alpha,\gamma$ ):	Interféron-( $\alpha,\gamma$ )
I $\kappa$ B:	Inhibiteur du facteur nucléaire kappa B
IL-(1,2,6,8):	Interleukine-(1,2,6,8)
i.v.:	Intraveineuse
JAK:	Protéine kinase de type Janus
L-NAME:	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginine méthyl ester
LPS:	Lipopolysaccharides

MDA:	Malondialdéhyde
MP:	Méthylprednisolone
3-MC:	3-Méthylcholanthène
NO <sup>•</sup> :	Oxyde nitrique
MAPK:	Mitogen activated protein kinase
1-MU:	Acide 1-méthylurique
3-MX:	3-Méthylxanthine
NADPH:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB:	Facteur nucléaire kappa B
NOS2:	Oxyde nitrique synthase inductible
OH <sup>•</sup> :	Radical hydroxyl
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> :	Radical superoxyde
P450:	Cytochrome P450
PKC:	Protéine kinase C
PPA:	Protéine de la phase aiguë
PTK:	Protéine tyrosine kinase
PXR:	Récepteur de pregnane X
RIA:	Réaction inflammatoire aiguë
RO <sup>•</sup> :	Radical alkoxy
ROO <sup>•</sup> :	Radical peroxy
RXR:	Récepteur des rétinoïdes X
s.c.:	Sous-cutané
S <sub>CONT</sub> ou RS <sub>CONT</sub> :	Sérum de lapin témoin

S <sub>CONT+U74389G</sub> :	Sérum de lapin témoin recevant le U74389G
SHP2:	Protéine tyrosine phosphatase 3
S <sub>INFLA</sub> ou RS <sub>INFLA</sub> :	Sérum de lapin avec une réaction inflammatoire aiguë
S <sub>INFLA+U74389G</sub> :	Sérum de lapin avec une réaction inflammatoire aiguë et recevant le U74389G
SOR ou ROS:	Substances oxygénées réactives
SMase:	Sphingomyélinase
STAT:	Signal transduction and activation of transcription
SRATB ou TBARS:	Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
TCDD:	Tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TIAR:	Réaction inflammatoire aiguë induite par la térébenthine
TNF:	Facteur de nécrose tumorale
U74389G:	Un dérivé des 21-aminostéroïdes
XO:	Xanthine oxydase

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Chez l'homme, certaines conditions physiopathologiques comme la maladie pulmonaire obstructive chronique ou encore une réaction inflammatoire infectieuse ou non-infectieuse peuvent réduire la clairance de médicaments tels que la théophylline. La réduction de la clairance des médicaments peut conduire à une augmentation de l'incidence de la toxicité et compromettre la vie des patients. Donc, il devient important de connaître les mécanismes qui sous-tendent la diminution du métabolisme des médicaments dans des conditions pathologiques évoluant avec une réaction inflammatoire pour éviter les effets adverses et améliorer la pharmacothérapie chez les patients.

La diminution de la clairance de la théophylline lors d'une réaction inflammatoire résulte d'une diminution de l'activité et de la quantité du cytochrome P450 hépatique. Plusieurs études ont montré que les cytokines produites lors d'une réaction inflammatoire sont les principaux médiateurs responsables de la dépression du P450 hépatique. Par ailleurs, la réaction inflammatoire aiguë induite par la térébenthine peut entraîner la production de substances oxygénées réactives (SOR) possiblement responsables de l'inactivation du P450 hépatique.

Les 21-aminostéroïdes ou lazaroïdes sont des dérivés de corticostéroïdes qui possèdent des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Il a été démontré que *in vivo*, l'administration du lazaroïde U74389G prévient complètement la dépression du P450 provoquée par une réaction inflammatoire aiguë. Considérant cette constatation, nous

nous sommes donné comme objectif de mettre en évidence le mécanisme d'action du U74389G dans la prévention de la dépression du P450 lors d'une réaction inflammatoire aiguë induite par l'injection sous-cutanée de térébenthine au lapin.

Dans l'Introduction nous allons réviser les mécanismes de biotransformation des médicaments, l'effet d'une réaction inflammatoire sur le cytochrome P450 ainsi que les propriétés des 21-aminostéroïdes.

## 1. Généralités sur la biotransformation des médicaments

L'organisme humain est exposé quotidiennement à une variété de substances étrangères appelées xénobiotiques, substances absorbées par le poumon ou la peau ou ingérées avec l'alimentation ou encore, consommées comme médicaments dans un but thérapeutique. Les médicaments et xénobiotiques qui pénètrent dans l'organisme doivent être biotransformés afin d'augmenter leur hydrosolubilité, réaction qui implique de nombreux mécanismes qui facilitent leur élimination (Katzung, 2001). C'est le caractère lipophile des médicaments qui permet leur passage à travers les membranes biologiques et l'accès à leurs sites d'action. L'excrétion rénale des médicaments lipophiles joue un rôle plutôt modeste dans l'élimination globale de ces substances. Ceci est dû au fait que ces composés une fois filtrés à travers le glomérule rénal sont réabsorbés à travers les membranes tubulaires. La biotransformation ou le métabolisme des médicaments et des xénobiotiques en composés plus hydrophiles est donc essentiel pour permettre leur élimination de l'organisme. En général, les médicaments et les xénobiotiques lipophiles sont transformés en substances plus polaires et par conséquent, plus facilement excrétables par l'organisme (Goodman et Gillman, 1996).

Les médicaments ayant subis des réactions métaboliques sont souvent moins actifs que la substance-mère et peuvent même être inactif. Par contre, dans certains cas, on peut assister à la génération de métabolites qui ont une plus grande activité ou qui possèdent des propriétés toxiques comme la cytotoxicité, la mutagénicité, la tératogénicité et la carcinogénicité. D'autre part, la synthèse de substrats endogènes

tels que les hormones stéroïdiennes, le cholestérol et les acides biliaires implique des voies enzymatiques métaboliques communes au métabolisme des xénobiotiques (Katzung, 2001).

### **1.1. Sites de biotransformation des médicaments**

La transformation métabolique des médicaments est généralement de nature enzymatique. Les systèmes enzymatiques impliqués dans la biotransformation des médicaments sont principalement situés au niveau du foie, bien que d'autres organes comme le rein, le tractus gastro-intestinal, la peau et le poumon possèdent aussi une capacité métabolique significative. La plupart des enzymes qui catalysent la biotransformation des médicaments est située au niveau du réticulum endoplasmique et du cytosol des cellules hépatiques. Pendant l'homogénéisation et la centrifugation différentielle des cellules, le réticulum endoplasmique est fragmenté et forme des microvésicules appelées communément des 'microsomes'. Les enzymes microsomiales incluent le cytochrome P450, la majorité des oxydases, des réductases de composés nitrés et des glucuronyl-transférases (Goodman et Gillman, 1996).

### **1.2. Réactions de phase I et réactions de phase II**

On peut classifier les réactions de biotransformation des médicaments en deux catégories:

- 1) les réactions non-synthétiques ou de phase I
- 2) les réaction de synthèse (conjugaison) ou de phase II.

Les réactions de phase I introduisent ou exposent un groupement fonctionnel sur la substance-mère et génèrent des métabolites qui sont souvent pharmacologiquement actifs. Ces réactions peuvent précéder ou pas les réactions de phase II. Il s'agit de réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Les enzymes impliquées dans ces réactions sont principalement localisées dans le réticulum endoplasmique.

Les réactions de phase II (ou de conjugaison) conduisent à la formation d'un lien covalent entre un groupement fonctionnel sur la molécule médicamenteuse et une substance endogène telle que l'acide glucuronique, le sulfate, le glutathion, certains acides aminés comme la glycine ou l'acétate. Les conjugués sont des molécules polaires généralement inactives et rapidement excrétées dans l'urine ou la bile. Contrairement aux enzymes de la phase I, les enzymes de la phase II se trouvent libres dans le cytosol (Goodman et Gillman, 1996).

### **1.3. Cytochrome P450**

Le cytochrome P450 est une superfamille d'enzymes microsomiales retrouvée chez les procaryotes et les eucaryotes. L'ensemble du cytochrome P450 comprend une hémoprotéine hydrophobe et un système de support qui fournit les électrons donnés par le NADPH via la flavoprotéine NADPH-cytochrome P450 réductase. Les enzymes cytochrome P450-dépendantes sont localisées dans le réticulum endoplasmique de plusieurs tissus. Elles constituent les principales enzymes du 'système de monooxygénases à fonction mixte'. La fonction importante de ces enzymes consiste à catalyser une réaction de monooxygénation pour rendre les substrats lipophiles plus

hydrophiles en introduisant un atome d'oxygène dans la molécule du substrat. Bien que le rôle commun principal de ces enzymes soit de favoriser l'élimination des xénobiotiques (ou des médicaments), il arrive fréquemment que ces enzymes donnent naissance à des intermédiaires réactifs ou des radicaux libres capables d'entraîner de la toxicité (Guengerich, 1992).

C'est en 1958 que Garfinkel a pu détecter la liaison d'un pigment des microsomes de foie au monoxyde de carbone (CO) en présence de dithionite. Le complexe montrait une absorption spectrophotométrique maximale à 450 nm, d'où le terme P450 (Garfinkel, 1958). Cependant, ce n'est qu'en 1964 que la nature hémoprotéique du complexe, c'est-à-dire du cytochrome P450, fut découverte par Omura et Sato (Omura et Sato, 1964). Chez les mammifères, ces enzymes sont retrouvées dans presque tous les tissus, mais elles sont plus abondantes au niveau du foie. Les enzymes du P450 comprennent une large superfamille de protéines dont la biosynthèse est contrôlée par une superfamille de gènes. La superfamille des enzymes du cytochrome P450 est, par commodité, abrégée sous forme de P450 et elles ont été regroupées en différentes familles selon le degré d'homologie de la séquence d'acides aminés de ces protéines. Les enzymes ayant >40% d'homologie dans leur séquence d'acides aminés sont classées en familles et identifiées par un chiffre arabe, par exemple, CYP1. Chaque famille est subdivisée en sous-familles d'enzymes. Les enzymes à l'intérieur d'une sous-famille possèdent >55% d'homologie de séquence et sont désignées par une lettre majuscule, par exemple CYP1A. Finalement, un chiffre arabe est employé pour

désigner chaque enzyme individuelle à l'intérieur d'une sous-famille, comme CYP1A1 et CYP1A2 (Nebert et coll., 1989; Testa, 1995).

Les gènes des familles 1, 2 et 3 du cytochrome P450 (*CYP1*, *CYP2* et *CYP3*) encodent pour les enzymes impliquées dans la biotransformation de la majorité des médicaments, tandis que les autres familles sont importantes pour le métabolisme de substances endogènes, telles que les hormones stéroïdiennes et les acides gras. Le CYP3A4 constitue l'isoenzyme le plus important pour la biotransformation d'un grand nombre de médicaments (Goodman et Gillman, 1996).

#### **1.4. Facteurs influençant la biotransformation des médicaments**

Des facteurs d'ordre génétique, environnemental et physiologique sont impliqués dans la régulation des réactions de biotransformation des médicaments. De fait, le polymorphisme génétique des enzymes d'oxydation et de conjugaison, l'usage concomitant de plusieurs médicaments, l'exposition aux polluants environnementaux et aux produits chimiques, les pathologies et l'âge sont des facteurs responsables de l'altération du métabolisme des médicaments. Ces facteurs peuvent diminuer l'efficacité, augmenter l'effet pharmacologique ou encore accroître la toxicité des médicaments. Le tableau I illustre les principaux facteurs qui influencent l'activité et la quantité des enzymes du P450 impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques :

**Tableau I****Facteurs influençant l'activité et la quantité des isoformes du cytochrome P450**

1. la diète	<b>1A1; 1A2 ; 2E1 ; 3A4</b>
2. la cigarette	<b>1A1 ; 1A2</b>
3. l'alcool	<b>2E1</b>
4. les médicaments	<b>1A1, 1A2; 2A6; 2B6; 2C ; 2D6; 3A4</b>
5. l'impact environnemental	<b>1A1, 1A2; 2A6; 1B ; 2E1; 3A4</b>
6. le polymorphisme génétique	<b>1A2; 2A6; 2C9, 2C19; 2D6</b>

Tiré de: Rendic et Di Carlo, 1997.

N.B. les enzymes en caractères gras sont impliquées dans le métabolisme de nombreux médicaments.

#### **1.4.1. Conditions pathologiques et le cytochrome P450**

La revue de la littérature indique que plusieurs états pathologiques influencent la capacité métabolique d'un individu et peuvent ainsi altérer l'élimination P450 dépendante des médicaments. Cependant, il faut noter que le métabolisme des médicaments peut être affecté différemment selon la pathologie en cause (Secor et Schenker, 1987; Bass et Williams, 1988; Howden et coll., 1989). Ceci peut être expliqué en partie par les différences qui existent dans les voies métaboliques impliquées. De plus, le métabolisme de chaque médicament est altéré de façon différente par diverses pathologies (Tröger et Meyer, 1995). Parmi les maladies qui peuvent affecter la quantité et l'activité du cytochrome P450, mentionnons les pathologies hépatiques telles que la cirrhose, l'insuffisance cardiaque, le diabète, l'inflammation.

Le métabolisme des médicaments au cours de maladies hépatiques peut être influencé par les changements histologiques (hépatite aiguë ou chronique, cirrhose) mais aussi par l'origine de ces dernières (virale, toxique ou immunologique). La capacité métabolique dépendra également de la sévérité de l'atteinte hépatique. Les isoenzymes du cytochrome P450 peuvent donc être atteintes de façon différentielle lors de ces affections (Paintaud et coll., 1996). Le mécanisme qui sous-tend la diminution de la biotransformation induite par les maladies hépatiques est expliqué par une diminution de la quantité des enzymes (due à une diminution du volume du foie) (Homeida et coll., 1979) et par une diminution de l'expression des gènes du P450 (George et coll., 1995).

Une étude réalisée par Teunissen et ses collaborateurs (1984) a montré que par rapport aux sujets normaux, la clairance de l'antipyrine est réduite de façon marquée chez les patients avec une cirrhose du foie. D'autres investigateurs ont rapporté que la cirrhose hépatique exerce un effet sélectif sur l'expression des cytochromes P450 hépatiques. Ainsi, les CYP1A2 et CYP2E1 étaient diminués dans les microsomes provenant des patients cirrhotiques alors que ces enzymes n'étaient pas affectées par un carcinome hépatocellulaire (Guengerich et Turvey, 1991). Quant à la quantité des CYP3A (représentant les isoformes 3A3, 4, 5 et 7), elle n'était pas altérée significativement même si une tendance à la baisse était détectée lors d'une cirrhose (Murray, 1992). De façon générale, la diminution de la biotransformation des médicaments est plus importante chez les patients avec une cirrhose du foie que chez ceux qui souffrent d'une dysfonction hépatique moins sévère telle que l'hépatite chronique ou la cholestase hépatique (Schoene et coll., 1972 ; Guengerich et Turvey, 1991; Meyer et coll., 1991; George et coll., 1995).

La diminution de la biotransformation hépatique des médicaments a également été observée chez des patients avec une insuffisance cardiaque (Jenne, 1986; Patel et coll., 1990; Huber et coll., 1992) et des patients avec une maladie pulmonaire obstructive chronique (Hendeles et coll., 1977; du Souich et coll., 1989). Des études *in vitro* révèlent que le métabolisme hépatique des médicaments est très vraisemblablement sensible à une réduction, même légère, de l'apport d'oxygène hépatique (Jones, 1981; Angus et coll., 1995). De plus, Ng et ses collaborateurs ont démontré, à l'aide d'un modèle animal, qu'une congestion hépatique due à une insuffisance ventriculaire

droite entraînait une diminution de la perfusion et de l'oxygénation du foie et que ces changements pouvaient être corrélés avec la diminution du métabolisme hépatique des médicaments (1995). D'autres études chez le lapin ont démontré que l'hypoxie diminue le métabolisme de médicaments tels que la lidocaïne (Marleau et coll., 1987), la phénytoïne (du Souich et coll., 1986) et la théophylline (Letarte et du Souich, 1984). En effet, chez le lapin, suite à 24 heures d'hypoxie, il y a diminution des protéines des isoenzymes CYP1A1, CYP1A2 (Kurdi et coll., 1999).

Le diabète mellitus de type I provoque une augmentation de la vitesse de biotransformation hépatique des médicaments. Par exemple, chez les diabétiques de type I, la clairance de l'antipyrine est augmentée de plus de 70% et l'index métabolique de la caféine (un indicateur de l'activité de CYP1A2) est plus élevé comparé à celui de sujets sains (Matzke et coll., 2000). Ces résultats sont en accord avec des études qui a démontré une augmentation marquée de la quantité des CYP1A1/1A2 chez des rats diabétiques (Bellward et coll., 1987; Ioannides et coll., 1988, Yamazoe et coll., 1989).

La quantité et l'activité du cytochrome P450 hépatique peuvent également être modulées lors d'une réaction inflammatoire infectieuse ou non-infectieuse. Nous aurons l'occasion d'en discuter davantage dans la section 2.1. portant sur l'effet de l'inflammation sur le cytochrome P450.

### 1.5. Inhibition et induction des isoformes du P450

Une caractéristique importante des P450 est leur propriété d'être induits et inhibés par de nombreuses substances. L'induction est un processus où une augmentation de la synthèse *de novo* des protéines des enzymes se produit suite à une exposition des substances ou des polluants environnementaux. L'induction résulte en une augmentation de la vitesse de la biotransformation et une diminution potentielle de l'activité pharmacologique. Dans le cas des médicaments qui sont biotransformés en métabolites actifs, l'induction peut entraîner une augmentation de l'activité et/ou toxicité. L'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (tels que le 3-méthylcholanthrène et le TCDD) et la cigarette (le benzopyrène) conduit à une induction dramatique des enzymes de la famille CYP1A hépatiques et extra-hépatiques. Les glucocorticoïdes et les anti-convulsivants induisent l'isoforme CYP3A4. Par ailleurs, l'isoniazide, l'acétone et la consommation chronique d'éthanol produisent une induction de l'isoforme CYP2E1. Il est à noter que plusieurs inducteurs des enzymes du P450 peuvent également affecter les enzymes impliquées dans le métabolisme de phase II, telles que les glucuronyltransférases et la glutathion-S-transférase. L'induction peut se manifester par une augmentation de la transcription des gènes qui codent pour les enzymes du P450 (CYP1A1) ou par une stabilisation de l'ARNm (CYP1A2) ou encore, une stabilisation de la protéine (CYP2E) (Goodman et Gillman, 1996).

Dans le cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), un récepteur cytoplasmique désigné AhR est activé et le complexe inducteur-récepteur est ensuite

transloqué au noyau où il se lie à une protéine nucléaire dénommée ARNT (Aromatic Receptor Nuclear Translocator). Par la suite, le dimère AhR-ARNT se lie aux éléments de réponse des gènes du 450, ce qui entraîne une augmentation de la transcription des isoformes du P450 (Hankinson, 1995).

L'inhibition des enzymes de biotransformation des médicaments résulte en une accumulation de la substance-mère, une augmentation de son effet pharmacologique et une augmentation de sa toxicité. L'inhibition enzymatique peut être compétitive et réversible ou de type irréversible. L'inhibition compétitive se produit lorsque deux ou plusieurs médicaments compétitionnent pour le site actif de l'enzyme, conduisant à une diminution de la biotransformation de l'un de ces substrats dépendant de la concentration relative de chaque substrat et de leur affinité pour cette enzyme. Un exemple d'inhibition compétitive est le cas de la cimétidine. La cimétidine inhibe le métabolisme P450-dépendant de plusieurs médicaments incluant la warfarine, les benzodiazépines, la phénytoïne et la morphine (Sedman, 1984). Dans une étude où la cimétidine était administrée à des patients recevant du diazépam pour le traitement de l'anxiété et l'insomnie, elle a augmenté les concentrations plasmatiques du diazépam et de son métabolite actif i.e. le desméthyldiazépam de 62 et 54%. Par conséquent, les patients s'endormaient plus rapidement et bénéficiaient d'un sommeil plus profond (Greenblatt et coll., 1984). L'inhibition irréversible, quant à elle, survient lorsque certains médicaments sont métabolisés par le P450 et que les intermédiaires métaboliques forment des complexes avec la partie hémique du P450, ce qui l'inactive de façon quasi-irréversible. Ce type d'inhibition peut être illustré avec

l'exemple d'un antibiotique, la triacétyloléandomycine. Ce médicament qui est similaire à l'érythromycine peut donner naissance à plusieurs interactions médicamenteuses. Par exemple, l'administration concomitante de la triacétyloléandomycine avec des contraceptifs oraux peut produire une cholestase hépatique ou une toxicité neurologique lorsqu'elle est utilisée avec la carbamazépine (Gibson et Skett, 1994).

On peut observer une inactivation irréversible des isoformes du P450 par des substrats suicides qui sont biotransformés par le P450 en métabolites intermédiaires actifs qui se lient de façon covalente à la partie héminique du P450 et le détruisent (ex. l'éthinyl estradiol, le norethindrone) (Goodman et Gillman, 1996).

## 2.- Réaction inflammatoire et P450

La réaction inflammatoire se définit comme l'ensemble des manifestations vasculaires, cellulaires et humorales stéréotypées intervenant au cours d'une réaction immunitaire non-spécifique. C'est une réaction qui constitue un des moyens de défense les plus efficaces de l'organisme face à un agresseur comme un virus, une bactérie, un traumatisme, une substance chimique etc. Il s'agit d'un processus qui vise la cicatrisation du tissu blessé le plus rapidement possible. L'inflammation est caractérisée cliniquement par de l'oedème, de la rougeur, de la chaleur, de la douleur et une perte de fonction du tissu lésé. Le processus inflammatoire est mis en branle au cours des minutes qui suivent une lésion tissulaire. Le développement de la réaction inflammatoire est assuré par différents médiateurs sécrétés par les cellules immunitaires et les plaquettes. Parmi ces médiateurs, citons les facteurs de coagulation, les amines vasoactives (histamine, sérotonine), les protéases, la bradykinine, le système du complément (C3a, C5a), les cytokines (interleukines, interférons), les prostaglandines, les leucotriènes et le facteur d'activation plaquettaire.

La plupart de ces médiateurs agit localement bien que certains agissent à distance : l'action pyrogène ou fièvre et la stimulation de la multiplication des macrophages et des granulocytes dans la moelle osseuse en sont deux exemples.

En regroupant l'ensemble des effets produits par ces médiateurs, on observe qu'ils :

- provoquent la vasodilatation des capillaires;
- augmentent la perméabilité vasculaire, c'est-à-dire l'exsudation plasmatique;
- assurent la chimiotaxie;
- provoquent la dégranulation des granulocytes basophiles et des mastocytes;
- stimulent la production de radicaux libres et d'ions superoxydes par les granulocytes neutrophiles;
- provoquent la fièvre;
- activent les macrophages (Regnault, 1988).

Durant le processus inflammatoire, les cytokines qui ont le rôle le plus important sont l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-6 et le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ). Il s'agit de polypeptides produits par plusieurs cellules mais principalement par les lymphocytes et les macrophages activés. En plus de leurs rôles régulateurs des réponses immunologiques, ils assurent des actions additionnelles importantes dans la réponse inflammatoire. L'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  déclenchent les effets systémiques de l'inflammation (fièvre, leucocytose, réponses neurologiques, réponse de stress, et effets hémodynamiques du choc septique). Au niveau de l'endothélium, ils provoquent une série de changements groupés sous le terme "d'activation endothéliale" (ex.: synthèse de protéines d'adhésion, de facteurs de croissance, d'autres cytokines, d'oxyde nitrique) (Eli Benjamini et coll., 1996).

## 2.1. L'inflammation et le cytochrome P450

Les premières indications d'une relation entre le système de défense de l'hôte et le métabolisme hépatique des médicaments ont été mises en évidence en utilisant des modulateurs du système réticulo-endothélial, qui incluent les cellules de Kupffer hépatiques. En 1953, Samaras et Dietz ont rapporté que le Trypan Blue (un stimulant des cellules de Kupffer) prolongeait la durée du sommeil de rats traités au pentobarbital. En 1978, Chang et ses collaborateurs ont rapporté une augmentation de la demi-vie plasmatique de la théophylline chez des enfants asthmatiques atteints d'une infection adénovirale ou de l'influenza. Au fil des ans, on a remarqué chez l'homme que le choc septique et les infections des voies respiratoires supérieures d'origine virale ou bactérienne comme *hemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumonia*, le virus de l'influenza B, *plasmodium falciparum* sont tous associés à une diminution de la clairance et du métabolisme de médicaments tels que la théophylline et l'antipyrine (Sonne et coll., 1985; Morgan, 1997). De plus, plusieurs études ont montré que la clairance de la théophylline est diminuée après une vaccination antigrippale ou une vaccination contre le BCG (Renton et coll., 1980; Gray et coll., 1983). L'administration de faibles doses d'endotoxine bactérienne (LPS) a également réduit la clairance de l'antipyrine, de l'hexobarbital et de la théophylline chez l'homme. Cette diminution de la clairance était corrélée avec l'augmentation de la concentration de l'interleukine IL-6 et du TNF- $\alpha$ . (Shedlofsky et coll., 1994).

Le facteur commun dans toutes ces études est la réaction inflammatoire qui entraîne une régulation négative de plusieurs isoformes du cytochrome P450 hépatique par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels (Morgan, 1997).

D'autres études ont montré que chez les animaux, les réactions inflammatoires non-infectieuses i.e. celles induites par la térébenthine, la carragénine et l'adjuvant de Freund, réduisent la quantité du P450 hépatique et diminuent la vitesse du métabolisme de plusieurs substrats et médicaments comme la tolbutamide et la théophylline (Beck et Whitehouse., 1974; Belpaire et coll., 1989; Ishikawa et coll., 1991; Parent et coll., 1992; Barakat et du Souich, 1996).

## **2.2. Rôles des cytokines dans la régulation du P450 hépatique**

En réponse à l'inflammation et l'infection, la concentration sanguine de plusieurs cytokines est fortement augmentée et ces dernières sont responsables de la sécrétion des protéines de la phase aiguë (PPA) par le foie (Ramshaw et coll., 1997). L'induction des PPA est surtout relayée par l'IL-6 qui agit en concert avec l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  (Baumann et Gauldie, 1990). Ce phénomène est accompagné d'une baisse de la synthèse de d'autres protéines comme l'albumine et les enzymes du cytochrome P450 (Morgan, 1997). En effet, plusieurs études ont proposé que des cytokines pro-inflammatoires notamment l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) qui sont les médiateurs les plus importants de la phase aiguë, contribuent à la diminution de l'activité et de la quantité du P450 hépatique (Chen et coll., 1992; Calleja et coll., 1997). La capacité de ces cytokines à déprimer le P450 hépatique a été documentée *in*

*vivo* suite à leur administration à des animaux et *in vitro* après leur incubation dans des hépatocytes. On assume que les cytokines sont responsables de la dépression du P450 parce que *in vitro*, elles peuvent déprimer plusieurs isoformes du P450 ainsi que leur ARNm.

En 1986, Ghezzi et ses collaborateurs ont rapporté qu'une injection d'IL-1 recombinante humaine à des souris entraînait 24 heures plus tard une diminution dose-dépendante de l'activité de l'éthoxycoumarin *O*-dééthylase. Ils ont également démontré que le transfert du sérum ou de macrophages péritonéaux des rats traités avec le LPS à une souche de rats résistante au LPS causait une réduction de l'activité du 7-éthoxyrésurfine *O*-dééthylase chez ces derniers. Plus tard, Ghezzi et ses collaborateurs (1986) ont pu démontrer que le TNF- $\alpha$  réprime le P450 et son activité chez la souris diminuant ainsi l'activité de la 7-éthoxycoumarine *O*-dééthylase dans le foie, le rein, le poumon et les glandes surrénales. Ces résultats ont conduit les investigateurs à proposer que l'IL-1 libérée des monocytes est responsable des effets *in vivo* sur le P450 hépatique du LPS ou du TNF- $\alpha$ .

Des preuves que l'IL-1 affecte les isoenzymes du P450 ont été présentées par d'autres investigateurs. De fait, l'injection de trois doses quotidiennes d'IL-1 $\alpha$  réduisait l'activité métabolique des CYP3A2, 2C11 et 1A1 chez les rats mâles, mais n'affectait pas l'activité du CYP1A1 chez les rates (Ferrari et coll., 1993). Par ailleurs, deux injections d'IL-1 $\alpha$  ont causé une diminution de l'expression du CYP2C11 et 3A2, mais pas celle du CYP2E1, mesurée 24 heures plus tard dans le foie des souris mâles

(Morgan et coll., 1994). Le traitement de rats avec le TNF- $\alpha$  produit également des effets sur l'expression de plusieurs isoformes du P450. Ainsi, une baisse de l'activité des CYP2C11, 3A2, mais pas celle de CYP2A1 ou 2C6, a été observée après 1 jour ou 3 jours de traitement avec le TNF- $\alpha$  (Nadin et coll., 1995). L'IL-6 affecte aussi l'activité et l'expression des P450 (Wright et Morgan, 1991; Morgan et coll., 1994; Chen et coll., 1992) puisque trois injections d'IL-6 et d'IL-1 au temps 0, 2 et 4 heures ont provoqué une dépression de l'ARNm et de la protéine du CYP2C11 et de l'ARNm du CYP2E1, mais elles n'ont pas affecté l'expression du CYP3A2 ou la quantité de protéine du CYP2E1 dans les 24 heures qui ont suivi ces injections (Morgan et coll., 1994).

D'autre part, différentes préparations d'interféron de même que des inducteurs d'interféron sont capables de réprimer l'expression constitutive et inductible des isoformes du P450. Par exemple, l'expression des enzymes constitutives telles que CYP3A2, CYP2C11, CYP2C12, CYP2E1 chez le rat (Craig et coll., 1990; Morgan et Norman, 1990; Morgan, 1991; Sakai et coll., 1992) et les CYP1A2 et CYP2C6 chez la souris (Stanley et coll., 1991) est réprimée par les interférons (IFNs) et/ou leurs inducteurs. Une seule injection d'un inducteur de l'interféron diminue l'expression constitutive de plusieurs P450 hépatiques chez le rat, à savoir le CYP2C11 (Sakai et coll., 1992; Morgan et Norman, 1990), 2C12 (Morgan, 1991), 1A1 (Sakai et coll., 1992), 1A2 (Cribb et coll., 1994; Sakai et coll., 1992) et 2E1 (Cribb et coll., 1994; Sakai et coll., 1992; Cribb et Renton, 1993). D'autres investigateurs ont démontré que

l'IFN- $\gamma$  déprime les CYP1A2, 2A6, 2B6 et 3A4 (Tapner et coll., 1996; Donato et coll., 1997).

Il existe également une autre manière d'étudier l'effet des cytokines sur l'expression des enzymes du P450. Cela consiste à utiliser des inducteurs enzymatiques (tels que le TCDD, le 3-MC, le  $\beta$ -naphthoflavone, la rifampicine ou la dexaméthasone) pour augmenter la transcription de certains gènes du CYP450 et à ensuite incuber ces cellules avec différents types de cytokines. Ainsi, l'induction de CYP3A1 (par la troléandomycine ou la pregnénolone 16- $\alpha$ -carbonitrile), du CYP1A (par la pyridine ou le  $\beta$ -naphthoflavone), du CYP2E1 (par la pyridine) et du CYP4A (par le clofibrate) est déprimée par les inducteurs d'interféron (Delaporte et coll., 1993; Wu et coll., 1994; Knickle et coll. 1992).

Dans les hépatocytes humains, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 diminuent substantiellement l'expression de l'ARNm des CYP1A1 et 1A2 induites précocément par le  $\beta$ -naphthoflavone tandis que l'IL-1 $\alpha$  n'a que peu d'effet (Muntané-Relat et coll., 1995). Il est intéressant de noter que l'expression constitutive et induite (par le 3-MC) de l'ARNm des CYP1A1 et 1A2 est fortement réduite dans des lignées cellulaires d'hépatome humain exposées au préalable à l'IL-6 (Fukuda et coll., 1992; Fukuda et coll., 1994). Par ailleurs, l'IL-6 inhibe l'expression de l'ARNm des CYP1A1, 1A2 et 2A3 dans les mêmes lignées cellulaires et l'expression inductible du CYP3A4 (par la rifampicine) dans des hépatocytes humains en culture (Fukuda et coll., 1994). De façon similaire, une autre étude a démontré que lorsque les hépatocytes humains sont

incubés avec le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, ces derniers provoquent une diminution de l'ARNm des CYP1A2, 2C, 2E1 et 3A et de l'activité catalytique des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A4 (Abdel-Razzak et coll., 1993).

D'autres travaux ont révélé que l'IFN  $\alpha/\beta$  réprime tous les isoenzymes majeurs inductibles du P450 incluant les CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, CYP2B et CYP3A1 (Stanley et coll., 1991; Anari et Renton., 1993; Delaporte et coll., 1993; Cribb et coll., 1994).

### **2.3. Mécanismes de modulation des cytochromes P450 par les cytokines**

Différentes études ont démontré qu'un stimulus inflammatoire produit une répression de l'ARNm d'un certain nombre d'isoformes du P450. Muntané-Relat et ses collaborateurs (1995) ont pu démontrer un parallélisme entre la diminution des ARNm et des protéines des CYP1A1, CYP1A2 et 3A4 en réponse aux cytokines. Ceci a suggéré que les cytokines n'affectent pas la vitesse de transcription des ARNm des isoformes du P450 mais par contre a soulevé la possibilité qu'elles réduisent les niveaux d'ARNm en interférant avec l'activation transcriptionnelle des gènes ou en augmentant la vitesse de dégradation des ARNm du P450 (Muntané-Relat et coll., 1995). Cette dernière possibilité paraît peu probable parce que la dégradation de l'ARNm des CYP450 hépatiques n'est en général pas une conséquence de l'inflammation; en effet, la dégradation de l'ARN est même inhibée chez les rats traités avec de la térébenthine (Saadane et coll., 1996).

### 2.3.1. Voies de signalisation conduisant à l'inactivation/répression du P450

Lors d'une réaction inflammatoire aiguë, les cytokines telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$  peuvent interagir avec des récepteurs membranaires sur la surface des hépatocytes. La liaison des cytokines pro-inflammatoires à leurs récepteurs active des voies de signalisation qui partagent des similitudes.

1) Dans les hépatocytes, la liaison de l'IL-6 à son récepteur active les protéines tyrosine kinase de type JAK (Schindler et coll., 1995) qui sont associées au récepteur et entraîne la phosphorylation subséquente des sous-unités de la protéine Stat (signal transduction and activation of transcription). Ces sous-unités forment ensuite des homo- ou hétérodimères qui constituent les facteurs de transcription actifs (Schindler et Darnell, 1995; Ihle, 1996). Des concentrations faibles d'IL-6 activent surtout la formation d'homodimères de Stats3 qui augmentent l'expression d'un facteur de transcription appelé c-myc et également la transcription des gènes codant pour les protéines de phase aiguë. D'autre part, l'IL-6 peut activer la cascade des MAPK(mitogen activated protein kinases) conduisant à l'activation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B (Ihle, 1996; Hirano, 1998; Middelton et coll., 2000; Kovalovich et coll., 2000).

2) L'IFN- $\gamma$  active les protéines tyrosine kinases (PTK) de la famille JAK/STAT qui induisent une surexpression de c-myc (Lee et coll., 1999). De plus, l'IFN- $\gamma$  induit la production de céramide et active la protéine p38-MAPK (Faune et coll., 1999) qui à leur tour activent le NF- $\kappa$ B (Zamanian et coll., 2000). L'IFN- $\gamma$  peut également induire l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (NOS2) en activant les protéines tyrosine kinase (PTK) et les protéines kinase C (PKC) (Sales et coll., 1999).

3) Le TNF- $\alpha$  peut activer plusieurs types de MAPKs incluant les PKC et les PTK et il stimule également les facteurs de transcription c-myc et NF- $\kappa$ B. (Kyriakis, 1999; Saklatvala et coll., 1999; Georgakopoulos et coll., 1995).

4) L'IL-1 $\beta$  stimule la cascade de signalisation qui implique la protéine kinase/c-Jun kinase (SAPK/JNK) et la p38-MAPK qui par la suite activent le NF- $\kappa$ B (Reznikov et coll., 2000; Parikh et coll., 2000). L'IL-1 $\beta$  stimule également la PKA AMPc-dépendante, la PKC (Bankers-Fulbright et coll., 1996), la PTK et il induit l'expression de c-myc (Kaszkin et coll., 1998).

Des résultats d'études *in vitro* démontrent que les effets des cytokines produites lors d'une réaction inflammatoire aiguë sont relayés par des facteurs de transcription tels que le NF- $\kappa$ B (Laflamme et Rivest, 1999; Wang et coll., 1999) et le c-myc (Kim et Baumann, 1999). Par conséquent, une surexpression de ces protéines pourrait être associée avec la répression du P450.

### **2.3.2. Les seconds messagers impliqués dans l'inactivation/répression du P450**

#### **2.3.2.1. Les substances oxygénées réactives et l'inflammation**

Les substances oxygénées réactives (SOR) représentent un ensemble de molécules dont la structure est caractérisée par la présence d'un ou de plusieurs atomes d'oxygène ainsi que par une relative instabilité. Elles existent sous la forme de radicaux libres ou sous forme non-radicalaire (Halliwell et coll., 1984). Un radical libre se définit comme étant une espèce moléculaire instable en raison de la présence d'un ou plusieurs électrons non-appariés au niveau de ses orbitales (Halliwell et coll.,

1992). Les SOR les plus importantes sont : le radical hydroxyle ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), le radical alkoyle ( $\text{RO}^{\bullet}$ ), le radical peroxy ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), le radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et l'oxyde nitrique ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) (Pryor, 1986).

Les SOR produites lors d'une réaction inflammatoire ont été impliquées dans la diminution de l'activité et/ou de la quantité des isoformes du P450. L'implication des SOR dans la dépression du métabolisme hépatique des médicaments a été pour la première fois documentée par Ghezzi et ses collaborateurs (1985). Ces investigateurs avaient constaté que l'IFN et ses inducteurs pouvaient activer la xanthine oxydase (XO) dans le foie, ce qui entraînait la génération de SOR, particulièrement l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Ghezzi et coll., 1984). De plus, ils ont pu démontrer que l'allopurinol (un inhibiteur de XO) et la N-acétylcystéine (un piègeur de radicaux libres) pouvaient atténuer la dépression de l'activité du P450 induite par l'administration d'un inducteur d'interféron i.e. le poly rI.poly rC (Ghezzi et coll., 1985). Puisque le cytochrome P450 microsomial est particulièrement sensible aux dommages peroxydatifs (Glende et coll., 1976; Kornburst et coll., 1980), Ghezzi et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que l'induction de XO et le dommage oxydatif causé par les SOR pourraient expliquer la diminution du P450 induite par l'interféron (Ghezzi et coll., 1985).

Plus tard, plusieurs études ont révélé à l'aide de modèles animaux que les réactions inflammatoires non-septiques augmentent les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (SRATB) telles que le malondialdéhyde dans les microsomes

hépatiques, les hépatocytes et le plasma (Proulx 1995a,b ; El-kadi et coll., 1997). Par ailleurs, Chen et ses collaborateurs (1995) ont démontré que *in vitro* les SOR induites par la réaction inflammatoire aiguë sont impliquées dans la voie de signalisation conduisant à la régulation négative du P450.

Plusieurs mécanismes pourraient contribuer à la production des SOR lors d'une réaction inflammatoire:

- a) les cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 sont capables d'activer la xanthine oxydase qui peut générer l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Ghezzi et coll., 1985),
- b) l'augmentation de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$  induit la production de prostaglandine E<sub>2</sub> (Zarco et coll., 1992), ce qui entraîne la réduction de prostaglandine G<sub>2</sub> en H<sub>2</sub> et conduit à la formation des SOR telles que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'O<sub>2</sub> (Cadenas et coll., 1983; Flohé et coll., 1985, Haliwell et coll., 1988),
- c) les polymorphonucléaires activés stimulent la myéloperoxydase qui génère l'acide hypochloreux, un agent oxydant qui pénètre dans les hépatocytes (Wasil et coll., 1987),
- d) l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et l'IFN- $\gamma$  peuvent activer la phospholipase A<sub>2</sub> (McPhail et coll., 1993) qui produit l'acide arachidonique. Ce dernier sera transformé la 5-lipoxygénase en leucotriènes qui génèrent des SOR (Bonizzi et coll., 1999). Par ailleurs, l'acide arachidonique et les leucotriènes pourraient activer la NADPH oxydase membranaire ou cytosolique qui est une source importante de SOR (Rhee, 1999),

- e) en réponse à différents stimuli comme la septicémie, les cytokines et la céramide activent les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale qui va générer des SOR; ces SOR jouent le rôle de second messagers pour activer des facteurs de transcription, l'expression de manganèse superoxyde dismutase, l'oxyde nitrique synthase et/ou entraîner l'apoptose (Degali Esposti et McLennan, 1998),
- f) finalement, dans les hépatocytes, plusieurs isoformes du P450 sont capables de générer des SOR (Serino et coll., 1993), plus spécifiquement le CYP2E1 peut produire le  $H_2O_2$  (Gergel et coll., 1997); les CYP3A4, 1A1, 1A2 et 2B6 produisent l' $O_2^{\bullet-}$  (Puntarulo et Cederbaume, 1998) et le CYP3A peut former le  $NO^{\bullet}$  (Kuo et coll., 1995).

Les SOR peuvent affecter l'activité et/ou la quantité des isoformes du P450 par différents mécanismes. Par ailleurs, il a été démontré que les générateurs de SOR sont capables de réduire l'activité du P450 (Flowers et Miles, 1991; Barker et coll., 1994). La quantité accrue de SOR dans le noyau pourrait endommager directement les gènes du P450 (Kim et coll., 1985; Southorn, 1988). Le  $H_2O_2$  réduit l'ARNm de plusieurs isoenzymes du P450 hépatique, effet qui est partiellement renversé par l'addition de N-acétylcystéine, suggérant que le  $H_2O_2$  agit via deux mécanismes : 1) il entraîne la régulation négative de l'expression des gènes du P450 (Pasco et coll., 1994), ce qui accroît davantage la production de SOR dans les hépatocytes (Bernhardt, 1995), 2) le  $H_2O_2$  formé dans le centre actif de l'hémoprotéine du P450 pourrait interagir avec le  $Fe^{2+}$  de l'enzyme conduisant à sa destruction et son inactivation (Karuzina et Archakov, 1994).

### **2.3.2.2. Les sphingolipides**

Dans plusieurs types cellulaires, l'IL-1 et le TNF induisent l'hydrolyse de sphingomyéline ce qui génère de la céramide qui pourrait jouer le rôle de second messenger dans la dépression du P450 (Hannun, 1994). L'élévation des niveaux intracellulaires de céramide produite lors de l'incubation de cellules avec la sphingomyélinase (SMase) peut mimer plusieurs des effets biologiques des cytokines, incluant les effets antiprolifératifs, la différenciation cellulaire et l'apoptose (Hannun, 1994) ainsi que l'activation des MAPKs (Wiegmann et coll., 1994) des jun-kinases (Kyriakis, 1994). Par ailleurs, la *D-erythro-N*-acétylsphingosine (un C<sub>2</sub>-céramide) et la SMAase miment l'effet de l'IL-1 dans la répression de l'expression du CYP2C11 et elles induisent l' $\alpha$ -1 glycoprotéine acide (protéine de la phase aiguë) dans les hépatocytes (Chen et coll., 1995), suggérant que les sphingolipides pourraient servir de second messagers dans la régulation du P450 hépatique et des gènes des protéines de la phase aiguë (Morgan, 1997).

### **2.3.2.3. Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique**

L'oxyde nitrique (NO) est un messenger cellulaire de courte demi-vie qui joue des rôles importants dans la régulation du tonus des systèmes cardiovasculaire et immunitaire. L'oxyde nitrique est généré à partir de L-arginine par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS). Cette réaction chimique requiert des cofacteurs comme le NADPH, la flavine adénine dinucléotide et la tétrahydrobioptérine. Il existe 3 isoformes de NOS qui ont été identifiées à ce jour, les isoformes I, II et III (Katzung, 2001). Les isoformes I et III sont constitutives et se retrouvent au niveau des cellules neuronales

et des cellules endothéliales. L'isoforme II ou NOS2 est inductible et elle est principalement exprimée dans les macrophages (incluant les cellules de Kupffer) et dans les hépatocytes en réponse aux stimuli inflammatoires (Bredt et Snyder, 1994; Morris et Billiar., 1994) et également dans le muscle lisse vasculaire (Katzung, 2001).

Le NO peut former un complexe de type fer-nitrosyl avec les hémoprotéines et les modifier de façon irréversible (Wink et al., 1993). De plus, le NO peut réagir avec le superoxyde pour produire le peroxy-nitrite qui donne naissance à des radicaux libres hautement toxiques comme le radical hydroxyl (Nathan., 1992).

Durant l'endotoxémie, les niveaux plasmatiques des produits d'oxydation du NO i.e. le nitrate et le nitrite, augmentent en raison de l'induction de l'expression de NOS2 dans le foie et les macrophages (Nathan, 1992; Geller et coll., 1994).

Lors d'une réaction inflammatoire, le foie est une source majeure de NO<sup>•</sup>. Plusieurs groupes ont proposé que le NO produit dans les cellules de Kupffer et/ou dans les hépatocytes puisse être responsable de la diminution de l'activité et de la quantité du P450 ainsi que des niveaux d'ARNm du P450 (Khatsenko et coll., 1993; Stadler et coll., 1994; Carlson et Billings., 1996; Donato et coll., 1997; Khatsenko et Kikkawa., 1997). En effet, le NO libéré suite à l'induction de NOS2 pourrait potentiellement affecter l'expression et l'activité du P450 à plusieurs niveaux. L'oxyde nitrique peut inactiver les isoformes du P450 par deux mécanismes. Premièrement, le NO interagit avec les atomes de fer ( $Fe^{2+}, Fe^{3+}$ ) du groupement hémique du P450 (Khatsenko et

coll., 1993), une réaction de nitration qui entraîne l'inactivation de l'enzyme (Khatsenko et coll., 1997, 1998). Deuxièmement, l'oxyde nitrique peut nitrer les résidus tyrosine situés à la proximité du site actif du P450, ce qui entraîne son inactivation (Janig et coll., 1987, 1988). De plus, il est également possible que les protéines ainsi nitrosylées soient dégradées par la cellule, ce qui diminuerait la quantité du P450.

Plusieurs laboratoires ont rapporté que les inhibiteurs du NOS peuvent prévenir la diminution de l'activité et de la quantité de P450 induite par l'exposition des animaux ou des cellules en culture à des stimuli inflammatoires comme le LPS, l'IL-1, l'interféron- $\gamma$  ou un mélange de ces agents (Khatsenko et coll., 1993; Stadler et coll., 1994; Carlson et coll., 1996; Donato et coll., 1997; Khatsenko et Kikkawa., 1997). Par ailleurs, les inhibiteurs de NOS sont capables de bloquer partiellement ou totalement la répression de l'ARNm des CYP450 causée par l'incubation d'un mélange de cytokines avec des hépatocytes ou par l'administration de LPS *in vivo* (Stadler et coll., 1994; Donato et coll., 1997; Khatsenko et Kikkawa., 1997).

#### **2.4. La réaction inflammatoire locale induite par l'injection de térébenthine**

Un modèle classique d'inflammation locale consiste à injecter de la térébenthine par voie sous-cutanée. L'administration sous-cutanée de la térébenthine entraîne une réaction inflammatoire locale aiguë (RIA) qui induit la production du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 par les macrophages et les mastocytes. L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  agissent ensuite sur

les cellules stromales, comme les cellules endothéliales et les fibroblastes, et ils stimulent la libération de l'IL-1 (auto-stimulation), de l'IL-6 et d'autres cytokines incluant l'IL-8, qui est un facteur chimiotactiques qui active les neutrophiles. Bien que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  puissent être détectés dans le plasma, les niveaux de l'IL-6 sont ceux qui sont le plus élevé (Lowry, 1993). Lors d'une réaction inflammatoire initiée à un site éloigné du foie, on peut s'attendre à ce que l'IL-6 atteigne ses plus hautes concentrations dans le voisinage des hépatocytes (Morgan, 1997).

En 1984, Mahu et Feldmann ont rapporté que la réaction inflammatoire induite par la térébenthine diminuait la concentration totale du cytochrome P450 chez le rat. Dans l'étude effectuée par Kobusch et ses collaborateurs (1986), l'injection sous-cutanée de térébenthine a entraîné la réduction de la N-déméthylation de l'aminopyrine, de la O-déalkylation du 7-éthoxycoumarin et de l'hydroxylation de l'aniline. Plus tard, des travaux de recherche effectués chez le lapin ont démontré que l'inflammation induite par l'injection de térébenthine diminuait la clairance de la tolbutamide en diminuant les isoenzymes du cytochrome P450 hépatique (Parent et coll., 1992). De plus, 48 heures après la production d'une réaction inflammatoire par l'injection sous-cutanée de térébenthine chez le lapin, la vitesse du métabolisme de la théophylline est diminuée. La cause de cette diminution est une régulation négative des CYP1A1 et 1A2 (Kurdi et coll., 1999).

Des études effectuées dans notre laboratoire ont permis de démontrer que le sérum de lapin avec une réaction inflammatoire aiguë (RIA) et le sérum de patient avec une

infection virale des voies respiratoires supérieures contient des médiateurs capables de diminuer l'activité catalytique du cytochrome P450 d'hépatocytes en culture provenant de lapins avec une RIA (El-Kadi et coll., 1997). Chez le lapin avec une RIA, le médiateur sérique primordial responsable de cette inactivation est la cytokine IL-6 alors que l'inactivation induite par le sérum de patient avec une infection des voies respiratoires supérieures est relayée par l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 (Bleau et coll., 2000).

Les résultats des études *in vivo* et *in vitro* suggèrent fortement que les SOR et spécialement l'oxyde nitrique jouent un rôle central dans l'inactivation du P450 par le sérum de lapin avec une RIA. Par ailleurs, la co-incubation de L-NAME (un inhibiteur de NOS) ou de N-acétylcystéine (un antioxydant) dans le milieu de culture des hépatocytes de lapin avec une RIA prévient partiellement la diminution de l'activité et de la quantité totale du P450 induite par le sérum de lapin avec une RIA et le sérum de patient avec une infection virale des voies respiratoires supérieures. Ces résultats expérimentaux indiquent que plusieurs SOR comme le NO $\cdot$ , le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le O<sub>2</sub> $\cdot^-$  contribuent à la diminution de l'activité du P450 hépatique (El-Kadi et coll., 2000).

Plusieurs observations supportent le fait que la réaction inflammatoire induite par la térébenthine induit une surproduction de SOR dans le foie. En effet, la RIA est associée avec une augmentation de la peroxydation lipidique intrahépatique, une diminution de l'activité du catalase, de la superoxyde dismutase et du glutathion peroxydase et une réduction des niveaux du glutathion réduit (GSH) (Proulx et du

Souich, 1995b). La diminution de la quantité totale du P450 induite par le sérum de lapin avec une RIA et le sérum de patient avec une infection virale des voies respiratoires supérieures dans des hépatocytes de lapins avec une RIA est directement associée à une augmentation de la peroxydation des lipides suggérant que les SOR sont impliquées dans la réduction du P450 total (El-Kadi et coll., 1997).

### 3. Les 21-aminostéroïdes

#### 3.1. Historique de l'usage des 21-aminostéroïdes

Les 21-aminostéroïdes ou lazaroïdes constituent une nouvelle famille de composés synthétiques dont la structure est analogue aux glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes (prednisone, méthylprednisone et dexaméthasone) sont des agents anti-inflammatoires et immunosuppresseurs très utiles dans le traitement des rejets d'allogreffe et des maladies auto-immunes (Buttgereit et coll., 1995). Cependant, les glucocorticoïdes entraînent des effets secondaires qui sont reliés au dosage et à la durée de l'administration (Seale et Compton., 1986). Les glucocorticoïdes répriment l'axe-hypothalamo-hypophysio-surrénalien, diminuent la résistance aux infections et induisent de l'hyperglycémie. En raison de la gravité de ces effets adverses, l'usage des glucocorticoïdes pour le traitement des maladies non-inflammatoires demeure très limité (Antonini et coll.,1995). Dans ce contexte, les lazaroïdes ont été développés dans le but de disposer de stéroïdes qui miment les effets neuroprotecteurs de fortes doses de méthylprednisolone (MP) pour le traitement des traumatismes crâniens sans effets secondaires graves (Buttgereit et coll., 1995).

Le tirilazad mesylate (U74006F) est le prototype des 21-aminostéroïdes (21-AS). Par rapport à la MP, les groupements hydroxyles des positions C-11 et C-17 ont été substitués par des fonctions  $-CH_3$ . L'addition d'une chaîne latérale contenant plusieurs groupements amino- à la position C-21 a réduit l'affinité de la molécule pour les récepteurs des glucocorticoïdes et a augmenté son effet antioxydant (Figure 1) (Spapen et coll., 1997).

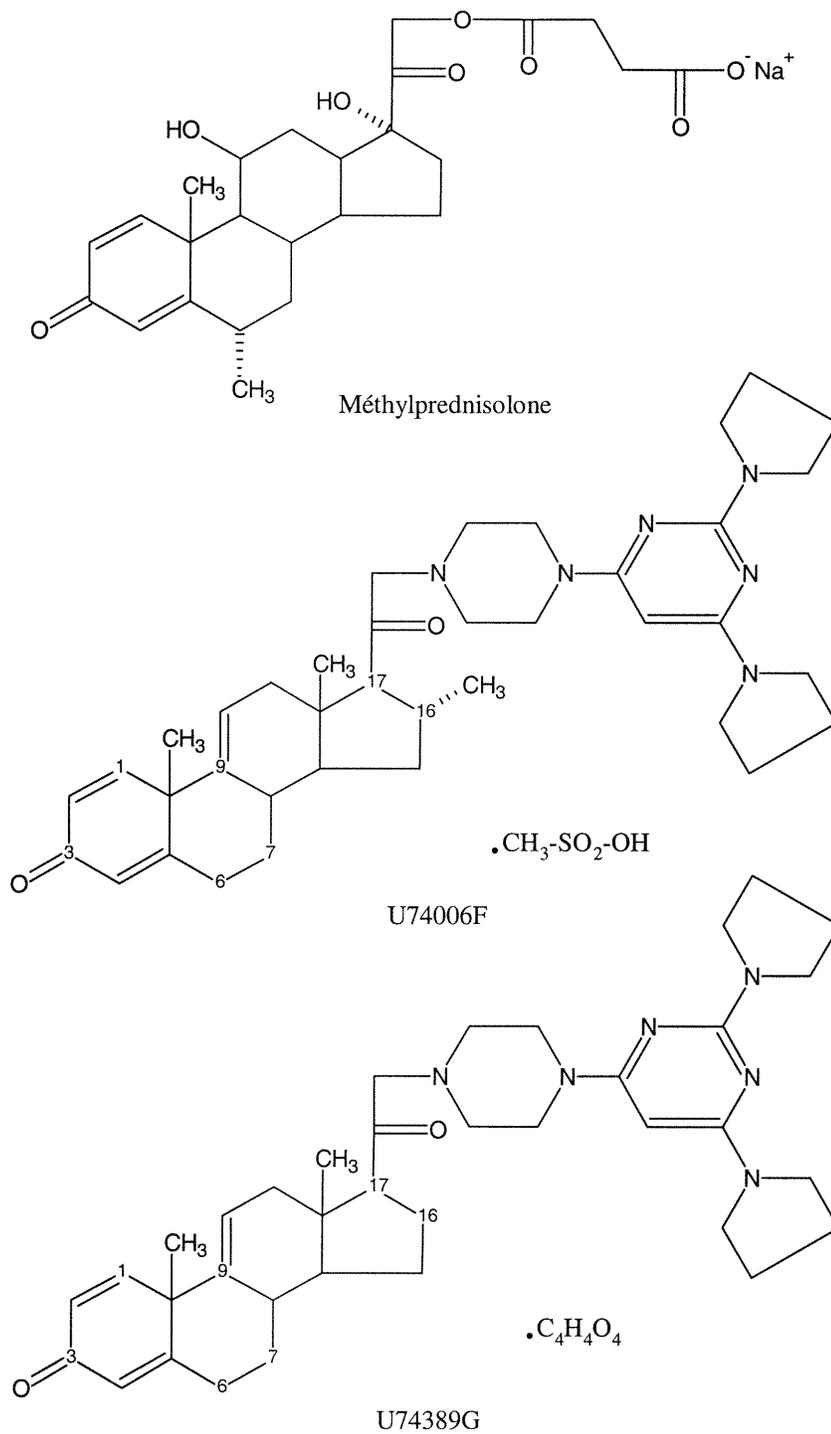


Figure 1: Structures chimiques de la méthylprednisolone et des 21-aminostéroïdes U74006F et U74389G

### 3.2 Mécanismes d'action des 21-aminostéroïdes

Les 21-aminostéroïdes sont avant tout reconnus pour leurs propriétés antioxydantes. Il a été démontré que, comparé à une forte dose de MP, l'U74006F est 10000 fois plus puissant pour inhiber la peroxydation fer-dépendant des lipides membranaires (Braugher et coll., 1987). Essentiellement, l'U74006F exerce ses effets cytoprotecteur par deux mécanismes coopératifs : 1) il piège des radicaux libres (un effet antioxydant chimique), tels le radical hydroxyl (Althaus et coll., 1991) et le lipide peroxy (Braugher et Pregoner., 1989) et le NO<sup>\*</sup> (Fernandez Rodriguez et coll., 1997) et 2) il exerce un effet stabilisateur puissant sur les membranes cellulaires (effet physico-chimique), ce qui contribue à limiter la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Hall et coll., 1994). En effet, en raison de leur grande liposolubilité, les 21-AS possèdent une haute affinité pour la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Ces composés s'incorporent dans la bicouche lipidique où ils occupent des positions et orientations bien définies (Hinzmann et coll., 1992). La partie stéroïde du tirilazad se localise à l'intérieur du domaine hydrophobique de la membrane et les groupements amines de la partie pyrimidine se localisent entre les têtes hydrophiles des phospholipides membranaires (Hall et coll., 1994).

Grâce à leurs effets cytoprotecteurs, les 21-AS peuvent inhiber la libération de l'acide arachidonique (Braugher et coll., 1987) et prévenir l'activation des cellules de Kupffer (Currin et coll., 1993). D'autre part, les lazaroïdes pourraient être efficaces en tant qu'agents anti-inflammatoires en atténuant la production des cytokines (Zhang et coll., 1995; Semrad et coll., 1993; Shenkar et Abraham., 1995), en réprimant l'expression des molécules d'adhésion (Meyer et coll., 1992) et en inhibant l'infiltration transendothéliale (Kitt et coll., 1989) et

l'activation des neutrophiles (Gadaleta et coll., 1994). Les 21-AS inhibent également la NADPH oxydase des neutrophiles activés (Thomas et coll., 1993) et préviennent la formation des eicosanoïdes par les neutrophiles (Gadaleta et coll., 1994).

#### **4. L'objectif de l'étude**

Une étude effectuée par Galal et du Souich (1999) a démontré que *in vivo* l'administration à des lapins du 21-aminostéroïde U74389G (Figure 1) prévient totalement la répression du P450 induite par la réaction inflammatoire aiguë.

Notre projet de recherche avait pour objectif de déterminer le mécanisme par lequel l'U74389G protège le P450 chez des lapins avec une RIA. En tenant compte des effets rapportés de l'U74389G, nous pouvons postuler que cette molécule prévient *in vivo* la régulation négative du P450 hépatique induite par une RIA par un effet antioxydant et/ou en inhibant les médiateurs sériques pro-inflammatoires.

Pour investiguer le site d'action de l'U74389G, antioxydant ou médiateurs sériques, nous avons incubé du sérum de lapins avec une RIA ( $S_{INFLA}$ ) avec des hépatocytes de lapins témoins et de lapins avec avec une RIA. Ces résultats ont été comparés à l'effet produit par du sérum de lapins avec une RIA mais ayant reçu du U74389G. Par ailleurs, nous avons réalisé les mêmes expériences mais en utilisant des hépatocytes de lapins ayant reçu du U74389G. L'effet du sérum a été évalué en mesurant l'activité des CYP1A1 et 1A2 à l'aide d'une sonde métabolique, la théophylline. La théophylline est métabolisée par plusieurs isoenzymes du cytochrome P450 hépatique (Robson et coll., 1987). Chez l'humain, la théophylline (1,3

diméthylxanthine) est biotransformée en trois métabolites : 1) l'acide 1-méthylurique, 2) l'acide 1,3-diméthylurique (le métabolite principal) et 3) le 3-méthylxanthine (Figure 2). De plus, nous avons évalué l'effet de l'U74389G sur l'expression des isoenzymes CYP1A1, 1A2 et 3A6. Finalement, l'effet antioxydant de l'U74389G a été évalué en mesurant la quantité de malondialdéhyde (un sous-produit de la peroxydation lipidique) dans les hépatocytes.

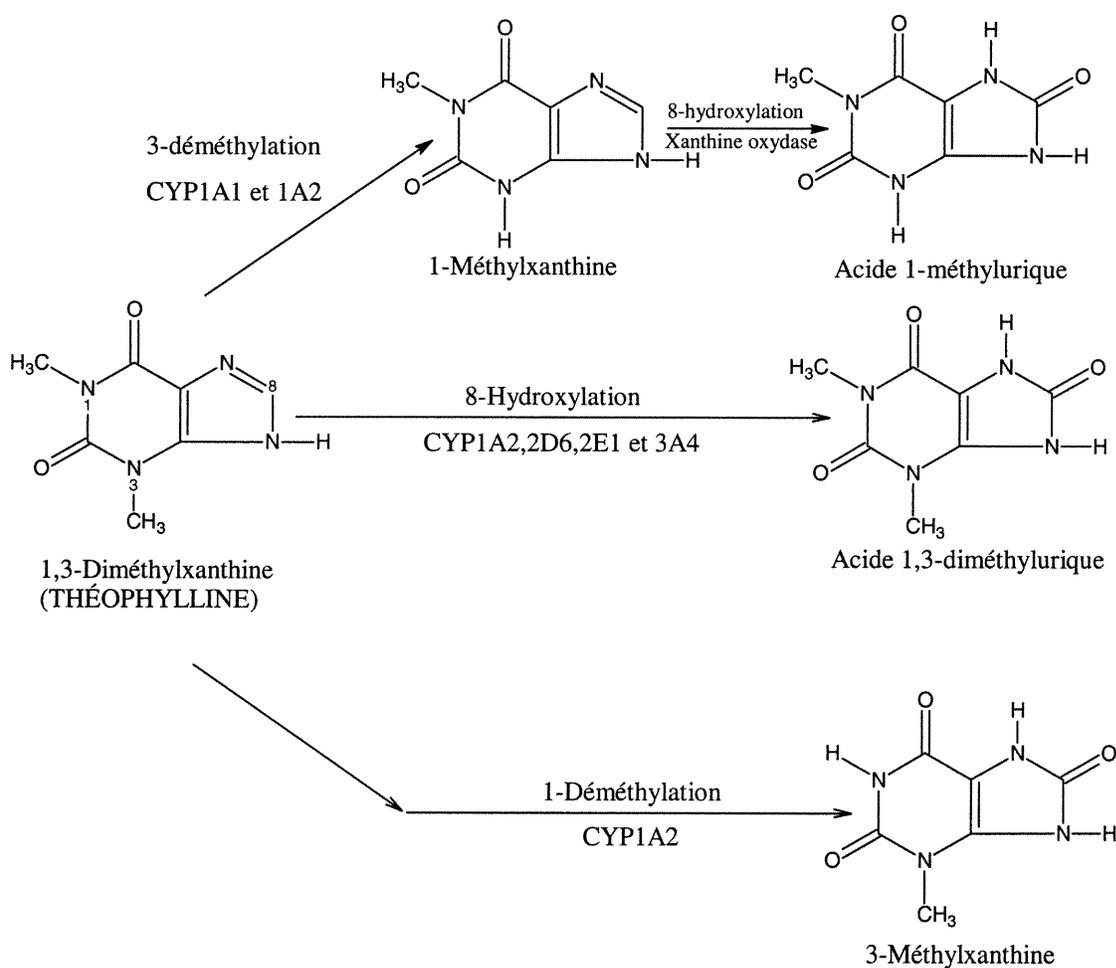


Figure 2. Schéma de la biotransformation de la théophylline chez l'humain adulte et les isoformes du cytochromes P450 qui sont impliquées dans la formation de ces métabolites (adapté de Sarkar et Jackson, 1994; Ha et al., 1995 et Zhang et Kaminsky, 1995)

Si le sérum des lapins avec une réaction inflammatoire recevant l'U74389G n'inhibe pas l'activité catalytique du P450 *in vitro*, cela indiquerait que l'U74389G agit en bloquant la formation des médiateurs sériques pro-inflammatoires (l'IL-6). D'autre part, si le  $S_{INFLA}$  ne diminue pas l'activité du P450 d'hépatocytes de lapins avec une RIA recevant le U74389G ( $H_{INFLA+U74389G}$ ), ceci suggérerait un effet direct du U74389G dans les hépatocytes. *In vitro*, l'absence d'une augmentation de MDA causée par le  $S_{INFLA}$  dans les  $H_{INFLA+U74389G}$  indiquerait que le U74389G agit en tant qu'antioxydant.

# **PRÉSENTATION DU MANUSCRIT**

(Soumis à Drug Metabolism & Disposition)

**THE AMINOSTEROID U74389G PREVENTS THE  
INFLAMMATION-INDUCED DOWN-REGULATION OF  
CYP1A1 AND 1A2 BUT NOT THE DEPRESSION OF CYP3A6 IN  
THE RABBIT<sup>1</sup>**

Mehrzaad Taherzadeh, Caroline Fradette, Anne-Marie Bleau and Patrick du Souich

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal,  
Québec, Canada

**Running title:** U74389G and P450 depression by inflammation

**Correspondence should be addressed to:** Patrick du Souich, MD, PhD  
Department of Pharmacology  
Faculty of Medicine  
University of Montréal  
P.O. Box 6128, Stat. Centre-Ville  
Montréal, Québec  
Canada H3C 3J7  
Telephone: (514) 343-6335  
Facsimile: (514) 343-2204  
E-mail: patrick.du.souich@umontreal.ca

**Key words:** cytochrome P450, aminosteroid U74389G, down-regulation, inflammation, turpentine, hepatocytes, rabbits.

Pages of text: 26

Number of tables: 1

Number of figures: 7

Number of references: 40

Number of words in abstract: 232

Number of words in Introduction: 495

Number of words in Discussion: 1105

**ABBREVIATIONS:** CYP, apoprotein of the cytochrome P450; 1,3DMU, 1,3-dimethyluric acid; H<sub>CONT</sub>, hepatocytes from a control rabbit; H<sub>INFLA</sub>, hepatocytes from a rabbit with a turpentine-induced acute inflammatory reaction; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL-, interleukin; L-NAME, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester; LPS, lipopolysaccharide; MDA malondialdehyde; 1MU, 1-methyluric acid; 3MX, 3-methylxanthine; NOS, nitric oxide synthase; P450, cytochrome P450; RS<sub>CONT</sub>, serum from a control rabbit;

RS<sub>INFLA</sub>, serum from a rabbit with a turpentine-induced acute inflammatory reaction;  
TIAR, turpentine-induced acute inflammatory reaction; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ;  
U74389G is a 21-aminosteroid.

## Introduction

In human, viral and bacterial infections as well as influenza and BCG vaccinations decrease the clearance of exogenous substances such as theophylline and antipyrine, secondary to a decrease in activity of multiple isoforms of the cytochrome P450 (P450) (Morgan, 1997). In animal models, infectious and non-infectious acute inflammatory reactions, such as those induced by endotoxin and turpentine, also diminish the rate of metabolism of xenobiotics (Morgan, 1997; Parent et al., 1992; Kurdi et al., 1999). The down-regulation of P450 triggered by a turpentine-induced inflammatory reaction is completely prevented by pretreatment of the rabbits with a 21-aminosteroid, the U74389G, (Galal and du Souich, 1999). The mechanism underlying the prevention of P450 down-regulation by U74389G remains unknown.

Turpentine-induced inflammatory reaction decreases hepatic P450 total content and activity and precipitates systemic as well as hepatic oxidative stress. Turpentine-induced oxidative stress is characterized by enhanced plasma antilipoperoxidant activity (Proulx et al., 1995a), and increased liver lipid peroxidation with concomitant diminution in reduced glutathione, and activity in superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase (Proulx et al., 1995b). Interestingly, the decrease in hepatic P450 total content is directly associated with the amount of hepatic lipid peroxidation (Proulx et al., 1995b). Incubation of hepatocytes from rabbits with turpentine-induced inflammatory reaction ( $H_{INFLA}$ ) with serum from rabbits with turpentine-induced inflammatory reaction ( $RS_{INFLA}$ ) for 4 h reduces P450 total content and activity and increments lipid peroxidation in  $H_{INFLA}$  (El-Kadi et al., 1997). The effect of  $RS_{INFLA}$  on P450 content and activity is dose-dependently prevented by  $N^{\omega}$ -nitro-L-arginine

methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase inhibitor, and by antioxidants such as N-acetylcysteine and dimethylthiourea, and potentiated by inhibitors of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase (El-Kadi et al., 2000). These observations clearly suggest that the decrease in P450 content and activity is closely associated to the activation of intracellular oxidative stress. On the other hand, the effect of  $RS_{INFLA}$  on P450 is prevented whenever  $RS_{INFLA}$  is incubated with anti-interleukin-6 (IL-6) antibodies, strongly suggesting that IL-6 is the serum mediator responsible for the  $RS_{INFLA}$ -induced decrease in P450 content and activity (Bleau et al., 2000).

21-Aminosteroids elicit an anti-lipid peroxidation effect through several mechanisms, among them, a vitamin E-like membrane antioxidant activity, inhibition of iron-catalyzed lipid peroxidation and superoxide anion scavenging (Braugher et al., 1988). In rabbits, U74389G completely averted the increase in lipid peroxidation produced by turpentine-induced inflammatory reaction (Galal and du Souich, 1999). On the other hand, 21-aminosteroids are potent inhibitors of the synthesis of several pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  (Fisher et al., 1993), IL-2 (Salahudeen et al., 1996), IL-6 (Lorenzl et al., 1995), IL-8 (Miniati et al., 1996), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Salahudeen et al., 1996), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Semrad et al., 1993).

Based on the fact that 21-aminosteroids are potent antioxidants and inhibit the synthesis of IL-6, we postulated that *in vivo*, U74389G prevents turpentine-induced inflammation down-regulation of hepatic P450 through an antioxidant effect in the  $H_{INFLA}$  and by inhibiting the synthesis of serum mediators. To assess the antioxidant effect of U74389G in  $H_{INFLA}$ ,  $RS_{INFLA}$  was incubated for 4 and 24 h with  $H_{INFLA}$  from

rabbits with and without pretreatment with U74389G; to document the effect of U74389G on serum mediators,  $RS_{INFLA}$  from rabbits with and without pretreatment with U74389G was incubated with  $H_{INFLA}$  for 4 and 24 h. In both instances activity and amount of CYP1A1 and 1A2 proteins were measured.

## Materials and Methods

### *Experimental protocol*

Male New Zealand rabbits (1.8-2.2 kg), were obtained from Ferme Charles River (St-Constant, Québec, Canada). Rabbits were housed in separate cages and fed water and rabbit chow *ad libitum* for at least 7 days before being used. Rabbits were randomly allocated to one of the following 4 groups: 1) Control group, where the rabbits (n = 3) were given an intravenous injection of saline (1 ml) every 12 h for 72 h, and in addition, these rabbits received subcutaneously (s.c.) 5 ml of saline at two distinct sites of their back 24 h after initiating the cycle of injections of saline; 2) Group of rabbits (n =3) receiving the 21-aminosteroid U74389G, 3 mg/kg every 12 h for 72 h, and a s.c. injection of 5 ml of saline 24 h after instituting the regimen with U74389G; 3) Group of rabbits (n =3) given an intravenous injection of saline (1 ml) every 12 h for 72 h, with an inflammatory reaction induced locally by injecting 5 ml turpentine (Recochem, Montréal, Québec) s.c. at two distinct sites of their back (Ashton et al., 1970; Parent et al., 1992) 24 h after the start of the saline injections; 4) Group of rabbits(n =3) receiving the 21-aminosteroid U74389G, 3 mg/kg every 12 h for 72 h, and a s.c. injection of 5 ml of turpentine at two sites of their back 24 h after instituting the regimen with U74389G . The dose of U74389G was determined in preliminary studies where it was demonstrated that this regimen achieved a response similar to that described elsewhere (Galal and du Souich, 1999). All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of laboratory animals.

Blood (10 ml) was withdrawn from the rabbits 72 h after initiating the cycle of saline/U74389G in a sterile Vacutainer Brand SST (Becton Dickinson, Mississauga,

Ontario, Canada), left at room temperature for at least 2 h, and thereafter centrifuged at 2500 r.p.m. for 5 min to obtain the serum. Rabbit's hepatocytes were isolated 48 h after the induction of the inflammatory reaction according to the two step liver perfusion method of Seglen (1976), with minor modifications (El-Kadi et al., 1997). Hepatocytes ( $4 \times 10^6$ /ml) were placed into 12-wells plastic culture plates (Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ) coated with Type I rat-tail collagen (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA); cells were suspended in William's medium E (WME) (Sigma Chemical Company) supplemented with 10% calf serum and insulin  $1 \mu\text{M}$  (Boehringer Mannheim GmbH, Germany). The plastic culture plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in a humidifier with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ . Viability was assessed before and after the incubation period by the trypan blue (0.2%) exclusion method, and in both instances the viability was over 90%.

Activity of CYP1A1 and 1A2 was documented by incubating with the hepatocytes theophylline for 4 h and 24 h, and measuring the formation of its metabolites, 3 methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU). Theophylline was dissolved in serum-free WME, and 50  $\mu\text{l}$  were added to each well containing the hepatocytes to attain a final concentration of 176  $\mu\text{M}$ . Theophylline was selected because it is primarily metabolized by CYP1A1 and 1A2 P450 isoforms (Sarkar and Jackson, 1994; Kurdi et al., 1999). At time zero, 350  $\mu\text{l}$  of the supernatant were collected from each well (control sample), and following 4 and 24 h of incubation, the remaining supernatant was collected and frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until theophylline, 3MX, 1MU and 1,3DMU were assayed by HPLC (du Souich et al., 1989).

The amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 proteins were assessed by Western blot analysis. Fifty  $\mu\text{g}$  of cell extract was separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% polyacrylamide) under non-reducing conditions (Smith, 1994). Separated proteins were electrophoretically transferred to a nitro-cellulose membrane using a semi-dry transfer process (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.). CYP1A1 and 1A2 were detected with a polyclonal anti-rabbit CYP1A1 (Oxford Biochemical Research, Oxford, MI, U.S.A.) diluted 1:100 in 5% nonfat milk in PBS/0.1% Tween 20 and visualized with an alkaline phosphatase conjugated secondary antibody using nitro blue tetrazolium as substrate (Kruger, 1994). CYP3A6 was detected with a monoclonal anti-rat CYP3A1 (Oxford Biochemical Research, Oxford, MI, U.S.A.) diluted 1:500 in 5% nonfat milk in PBS/0.1% Tween 20 using a secondary antibody conjugated with chemiluminescence reagent (horseradish peroxidase enzyme) and visualized by autoradiography (Thorpe et al., 1985). The intensities of the bands were measured with the software Un-Scan-It-Gel (Silk Scientific Inc., Orem, Utah).

Lipid peroxidation in the hepatocytes induced by the turpentine-induced inflammation and the experimental conditions was assessed measuring the amount of malondialdehyde formed in hepatocytes by the thiobarbituric acid reaction (Ohkawa et al., 1979). The protein content in the hepatocytes was determined by the method of Lowry *et al.* (1951).

#### *In vitro studies*

These studies aimed to document whether U74389G prevented the down-regulation and decrease in activity of the P450 by protecting the cell or by suppressing

the release of serum mediators. To this purpose, 1) hepatocytes from control rabbits receiving saline ( $H_{\text{CONT}}$ ), 2) hepatocytes from control rabbits receiving U74389G ( $H_{\text{CONT}+\text{U74389G}}$ ), 3) hepatocytes from rabbits with the turpentine-induced inflammatory reaction and treated with saline ( $H_{\text{INFLA}}$ ), and 4) hepatocytes from rabbits with the turpentine-induced inflammatory reaction and treated with U74389G ( $H_{\text{INFLA} + \text{U74389G}}$ ) were incubated with 200  $\mu\text{l}$  of 1) serum from control rabbits receiving saline ( $S_{\text{CONT}}$ ) 2) serum from control rabbits receiving U74389G ( $S_{\text{CONT} + \text{U74389G}}$ ), 3) serum from rabbits with the turpentine-induced inflammatory reaction and treated with saline ( $S_{\text{INFLA}}$ ), and 4) serum from rabbits with the turpentine-induced inflammatory reaction and treated with U74389G ( $S_{\text{INFLA} + \text{U74389G}}$ ) for 4 h and 24 h. Each of the sixteen experiments included  $n = 9$ . It has already been demonstrated that incubation of  $H_{\text{INFLA}}$  with  $S_{\text{INFLA}}$  for 4 h decrease the activity of CYP1A1 and 1A2 (El-Kadi et al., 1997). With the present experimental protocol, whenever  $S_{\text{INFLA}}$  cannot decrease P450 activity of  $H_{\text{INFLA} + \text{U74389G}}$  it shall indicate that U74389G prevents the decrease in P450 activity by an intracellular mechanism. On the other hand, whenever  $S_{\text{INFLA} + \text{U74389G}}$  cannot decrease P450 activity of  $H_{\text{INFLA}}$  it shall indicate that U74389G reduces the release of serum mediators.

#### *Drugs and chemicals*

Insulin was purchased from Boehringer Mannheim GmbH (Germany), while Hepes, EGTA, WME, trypsin inhibitor, type IV collagenase, type I rat-tail collagen, calf serum, theophylline and its metabolites, and other chemicals were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). U74389G was obtained from Biomol Research Laboratories, Inc., PA, USA.

*Statistical analysis*

All results are reported as mean  $\pm$  s.e. The comparison of the results from the various experimental groups and their corresponding controls was carried out using a one way analysis of variance (ANOVA) followed if necessary by Newman-Keuls post hoc tests. The differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ .

## Results

### *Effect of U74389G in vivo on the activity and expression of CYP1A1, 1A2 and 3A6*

Compared with rabbits receiving NaCl every 12 h for 72 h, the injection of U74389G did not modify the biotransformation of theophylline (Figure 3). Turpentine-induced acute inflammatory reaction (TIAIR) reduced the output of 3MX, 1MU and 1,3DMU by 23, 32 and 34%, respectively ( $p < 0.05$ ). In the hepatocytes of rabbits that were pretreated with U74389G for 72 h and had a TIAIR, the biotransformation of theophylline was not different from that observed in hepatocytes from control rabbits.

The reduction in the rate of theophylline biotransformation 48 h after the initiation of the TIAIR, was secondary to the decrease in the expression of CYP1A1 and 1A2 proteins (Figure 4). Pretreatment of the rabbits with U74389G completely prevented the down-regulation of CYP1A1 and 1A2 produced by the TIAIR. By comparison with hepatocytes from control rabbits, in hepatocytes from rabbits with TIAIR, the expression of CYP3A6 was reduced by approximately 50% (Figure 4). Interestingly, pretreatment with U74389G, not only prevented the CYP3A6 down-regulation by the TIAIR but it increased its expression by 40%.

Hepatic lipid peroxidation, assessed by the production of malondialdehyde increased from  $0.050 \pm 0.003$  nmol/mg of protein in hepatocytes of control rabbits to  $0.107 \pm 0.004$  nmol/mg of protein in hepatocytes harvested from rabbits with TIAIR ( $p < 0.05$ ). Pretreatment of the rabbits with U74389G prevented the increase in lipid peroxidation promoted by the TIAIR, i.e. malondialdehyde concentrations were  $0.510 \pm 0.002$  nmol/mg of protein.

*Effect of U74389G on the serum mediators responsible for the reduction in P450 activity*

When  $S_{INFLA}$  was incubated for 4 h with  $H_{CONT}$ , the output of theophylline metabolites tended to decrease, i.e. 3MX by 39%, 1MU by 9% and 1,3DMU by 21% ( $p>0.05$ ) (Figure 5). On the other hand, this trend was not apparent when  $H_{CONT}$  were incubated with  $S_{INFLA} + U74389G$ , i.e. the relative change in 3MX, 1MU and 1,3DMU was 0, 0 and 9%, respectively. Compared to  $S_{CONT}$ , incubation of  $S_{INFLA}$  for 4 h with  $H_{INFLA}$  reduced the production of theophylline metabolites by around 25% ( $p<0.05$ ) (Figure 6). The  $S_{INFLA}$ -induced decrease in P450 activity was totally prevented when the serum was from rabbits with a TIAIR and been pretreated with U74389G for 72 h. That is, *in vivo* pretreatment of rabbits with a TIAIR with U74389G abrogated the ability of the serum to inactivate P450.

Incubation of  $S_{INFLA}$  with  $H_{CONT}$  increased hepatic lipid peroxidation by 40% ( $p<0.05$ ) (Figure 7). Compared to  $H_{CONT}$ , lipid peroxidation in  $H_{INFLA}$  was two fold greater ( $p<0.05$ ), and addition of  $S_{INFLA}$  further increased the production of malondialdehyde by 25% ( $p<0.05$ ). However, the incubation of  $S_{INFLA} + U74389G$  with  $H_{INFLA}$  did not promote any increase in lipid peroxidation (Figure 7), supporting that pretreatment of rabbits with TIAIR with U74389G prevents the release of serum mediators.

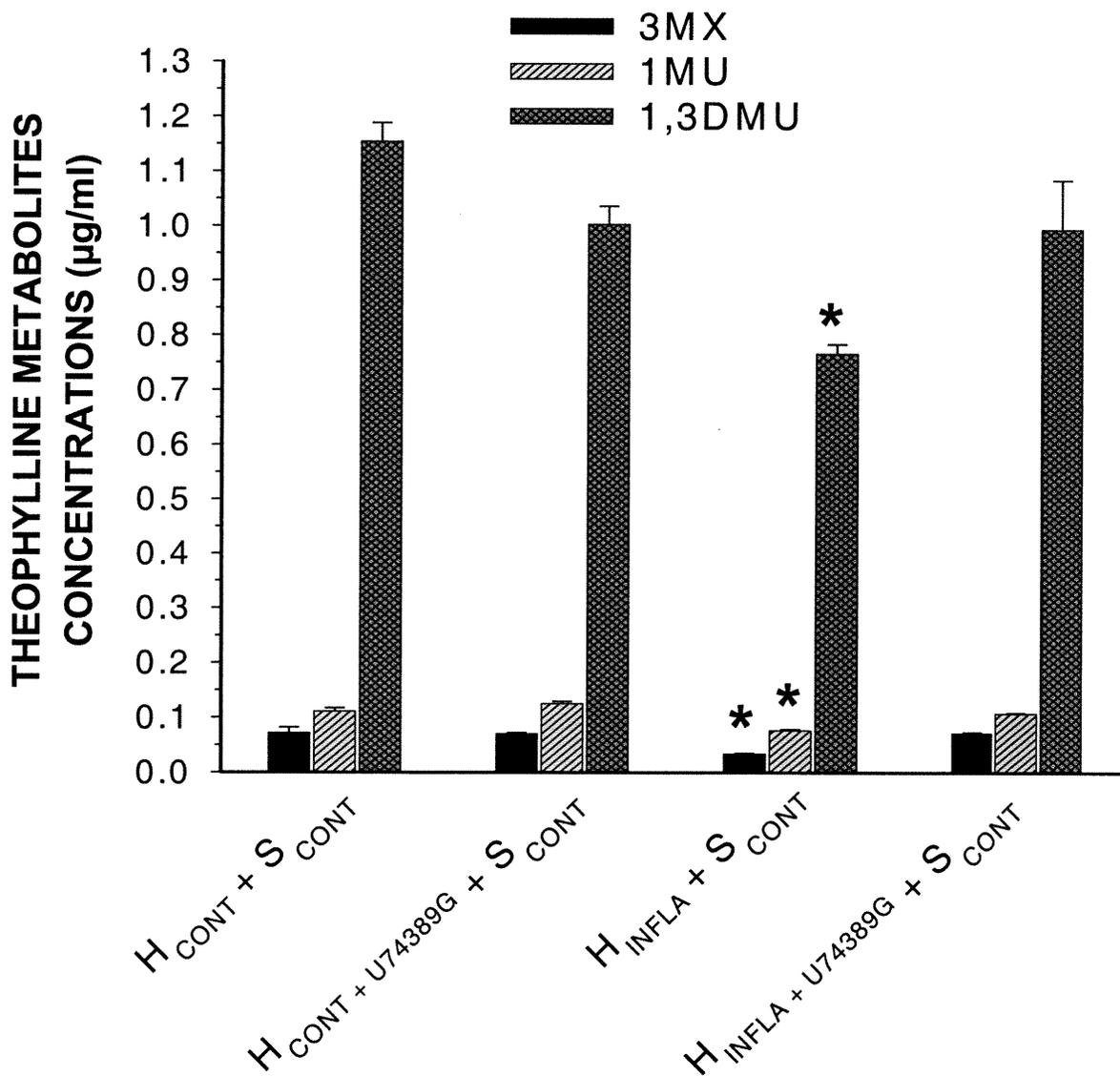
Incubation of  $H_{CONT}$  and  $H_{INFLA}$  with  $S_{INFLA}$  for 24 h resulted in a reduction in the production of 1MU and 1,3DMU by 37 and 21%, respectively ( $p<0.05$ ) and an increase in hepatic lipid peroxidation ( $p<0.05$ ) (Table II). However, incubation of

$S_{INFLA} + U74389G$  with  $H_{CONT}$  and  $H_{INFLA}$  did not reduce the rate of biotransformation of theophylline and did not promote hepatic lipid peroxidation.

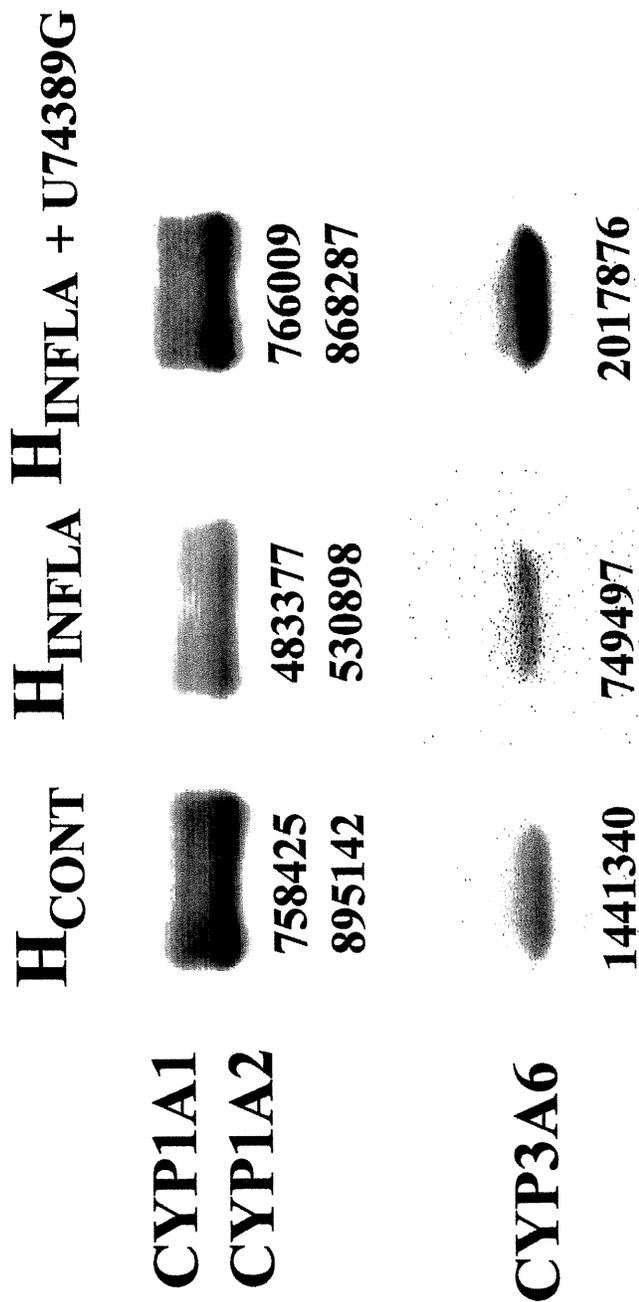
*Effect of U74389G on the modulation of hepatic P450 activity*

When control rabbits were pretreated with U74389G,  $S_{INFLA}$  did not modify the rate of theophylline biotransformation in  $H_{CONT} + U74389G$  after 4 or 24 h of incubation (Figure 8; Table II). In addition, pretreatment of rabbits with TIAIR with U74389G prevented the decrease in P450 activity in  $H_{INFLA} + U74389G$  prompted by  $S_{INFLA}$  after 4 or 24 h of incubation (Figure 9; Table II), suggesting that pretreatment of rabbits with U74389G prevents the decrease in activity secondary to the serum mediators.

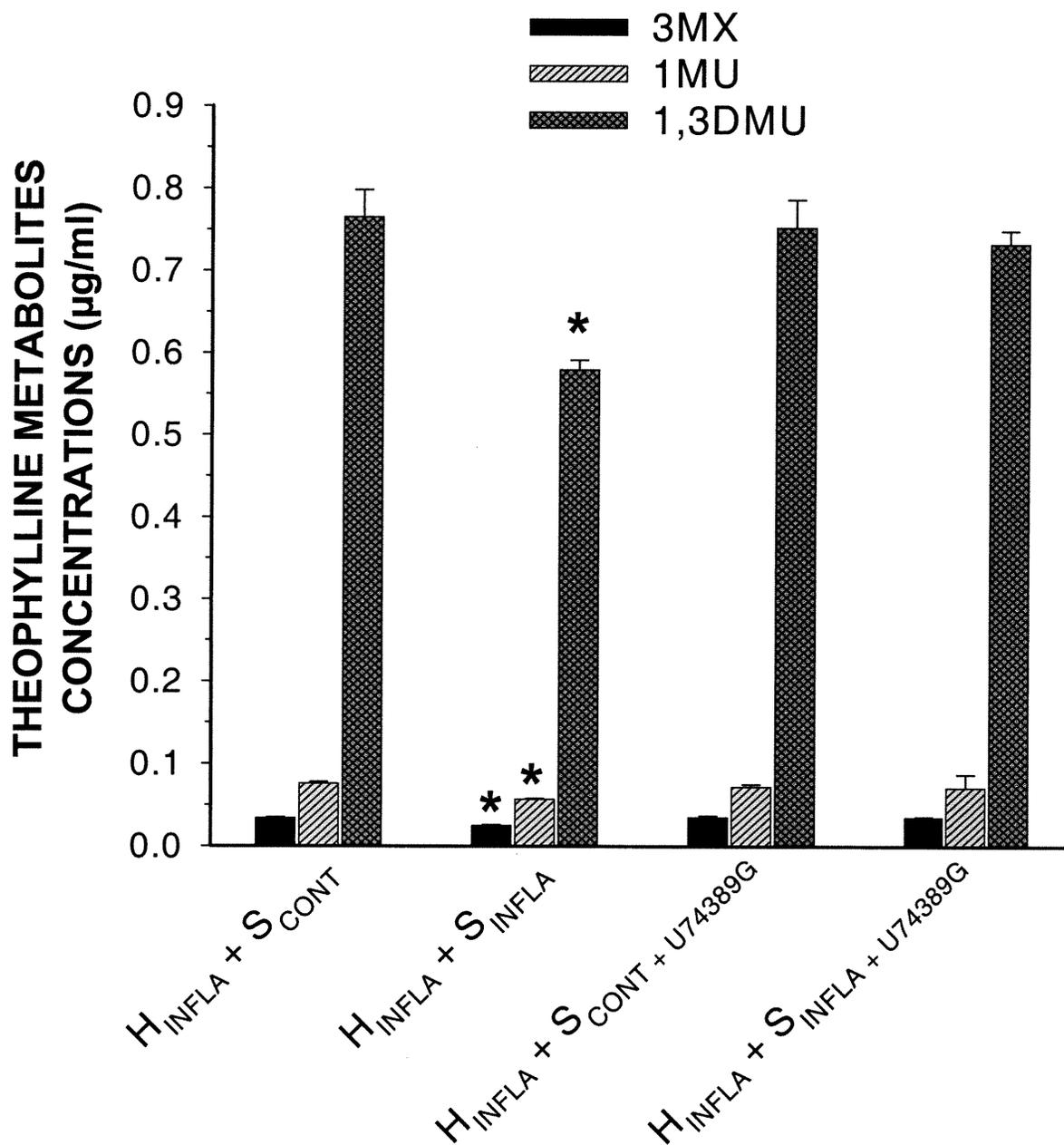
Incubation of  $S_{INFLA}$  for 4 and 24 h with  $H_{CONT} + U74389G$  did not result in an increase in hepatic lipid peroxidation (Figure 7; Table II). Pretreatment of the rabbits with TIAIR with U74389G did not prevent the increase in malondialdehyde when  $S_{INFLA}$  was incubated with  $H_{INFLA} + U74389G$  (Figure 7) even if the biotransformation of theophylline was normalized (Figure 9). However, when  $H_{INFLA} + U74389G$  was incubated for 4 or 24 h with  $S_{INFLA} + U74389G$  hepatic lipid peroxidation did not increase (Figure 7; Table II).



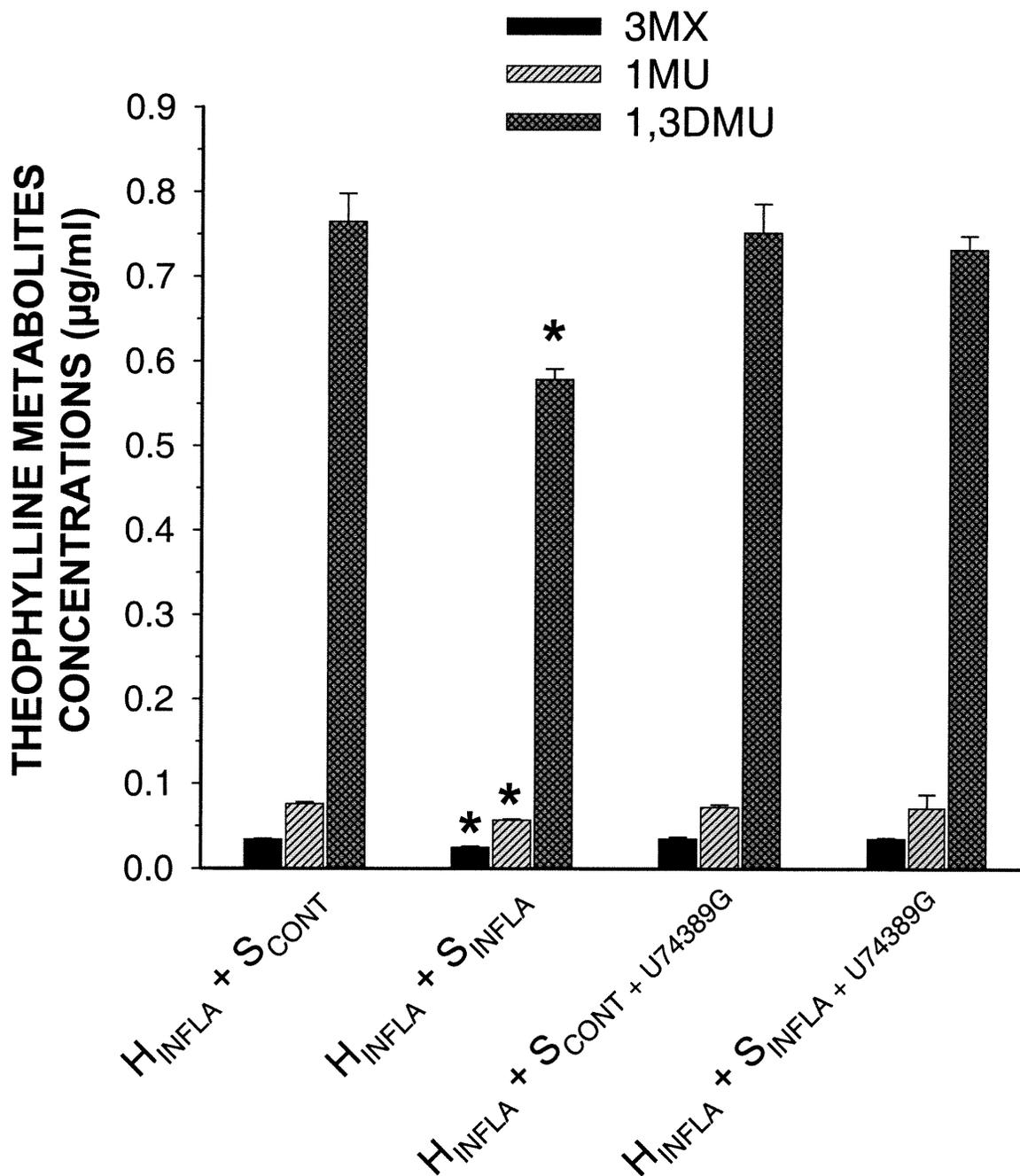
**Figure 3.** Effect of 21-aminosteroid U74389G on the production of theophylline metabolites, 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) when hepatocytes from control rabbits ( $H_{\text{CONT}}$ ) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction ( $H_{\text{INFLA}}$ ) pretreated or not with U74389G are incubated for 4 h with serum of control rabbits ( $S_{\text{CONT}}$ ). \*  $p < 0.05$  compared to  $H_{\text{CONT}} + S_{\text{CONT}}$ . Vertical bars are s.e.m.



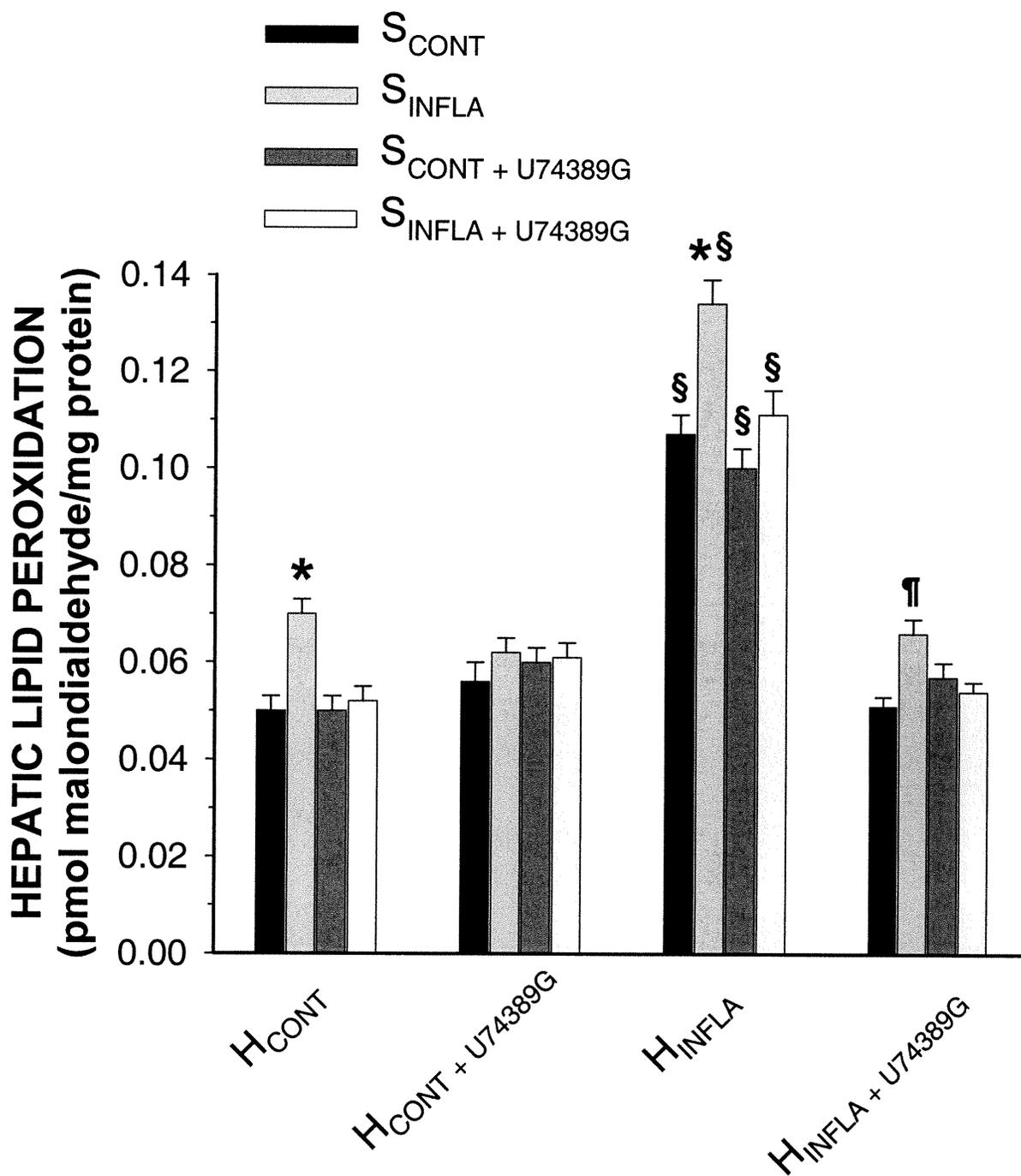
**Figure 4.** Amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from control rabbits ( $H_{\text{CONT}}$ ), rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction ( $H_{\text{INFLA}}$ ), rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction but having received U74389G for 72 h ( $H_{\text{INFLA}} + \text{U74389G}$ ). Numbers are densitometric values of the bands.



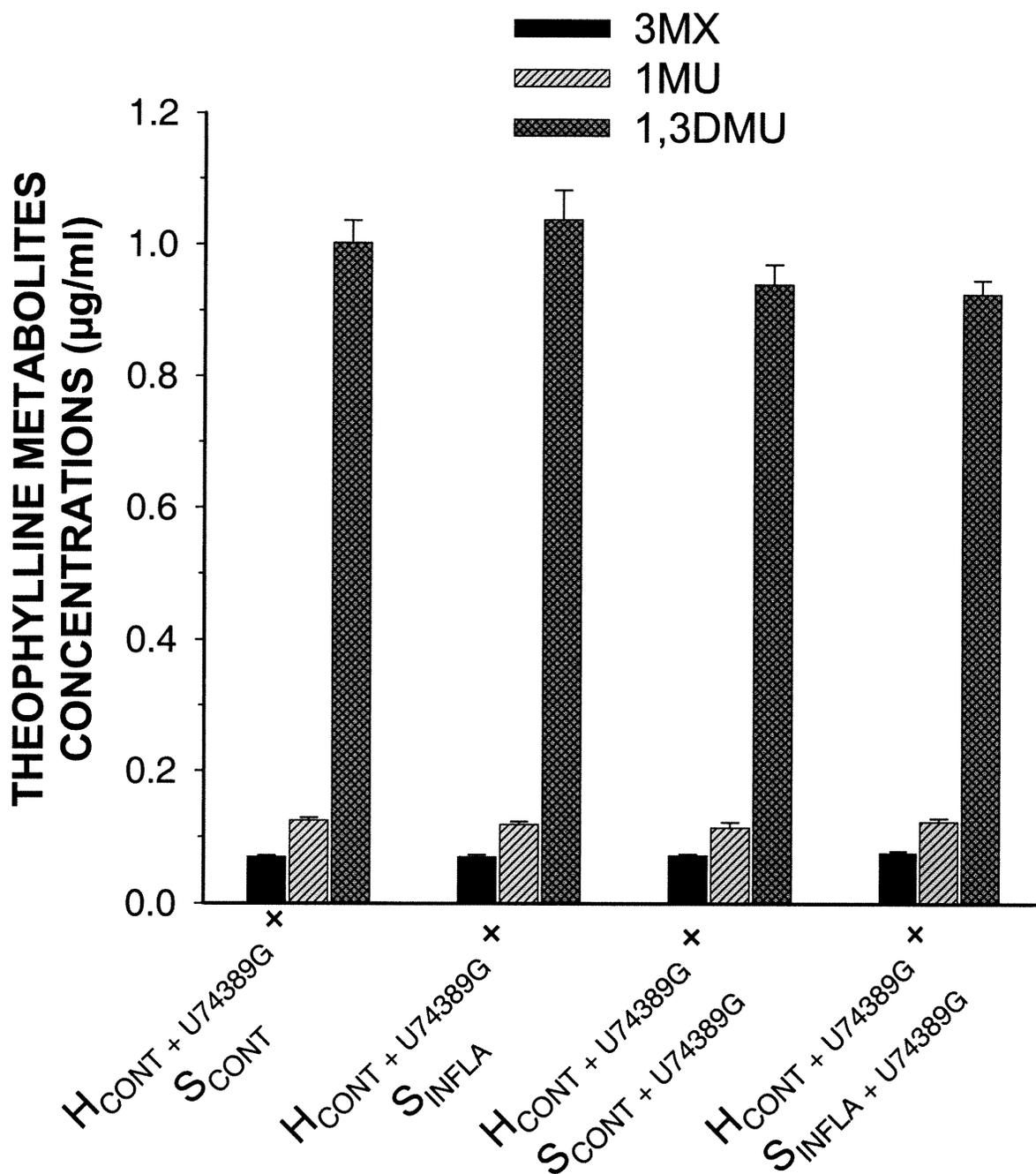
**Figure 5.** Effect of 21-aminosteroid U74389G on the production of theophylline metabolites, 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) when hepatocytes from control rabbits (H<sub>CONT</sub>) are incubated for 4 h with serum of control rabbits (S<sub>CONT</sub>) and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (S<sub>INFLA</sub>) pretreated or not with U74389G. \* p<0.05 compared to H<sub>CONT</sub> + S<sub>CONT</sub>. Vertical bars are s.e.m.



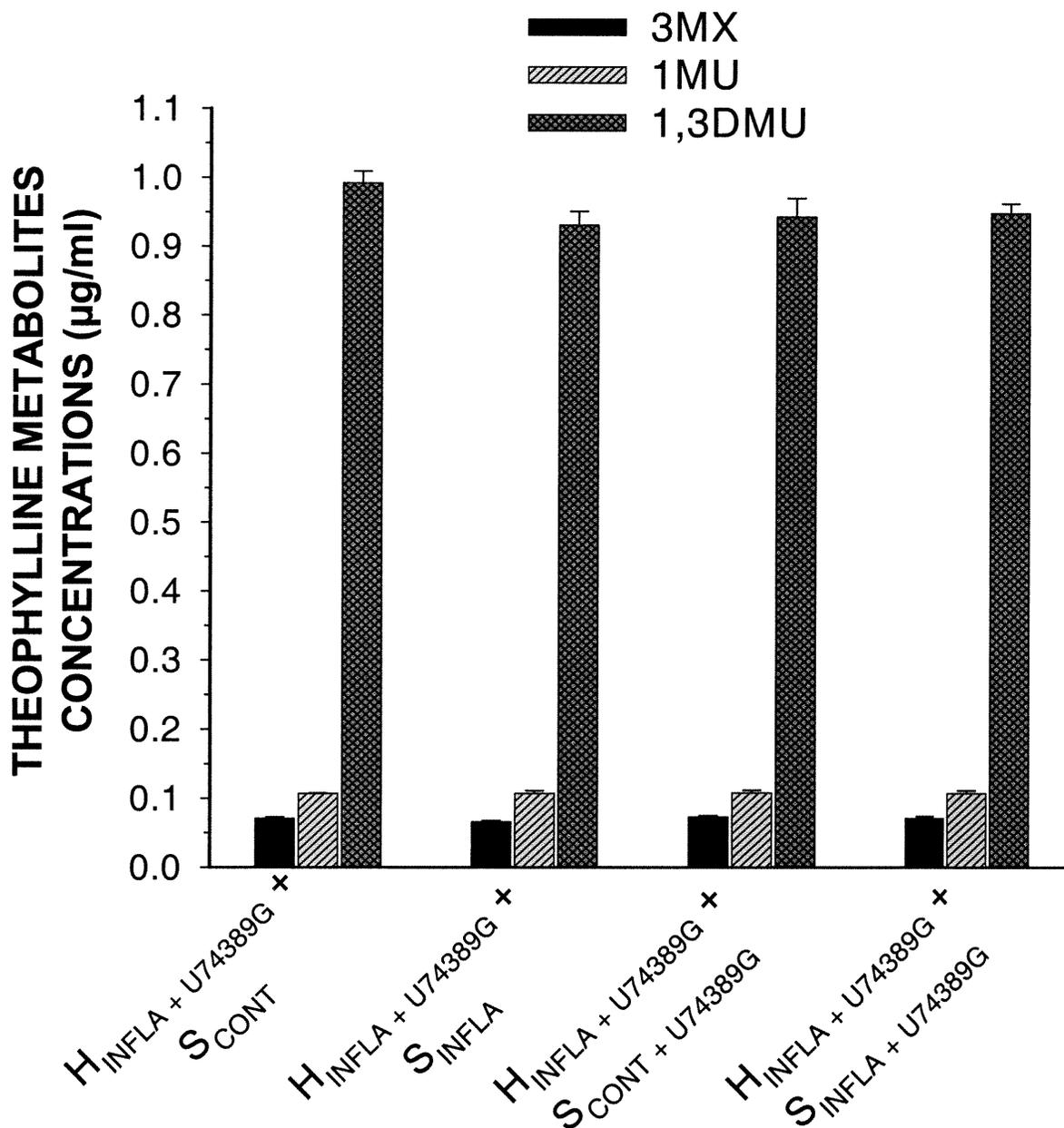
**Figure 6.** Effect of 21-aminosteroid U74389G on the production of theophylline metabolites, 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) when hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H<sub>INFLA</sub>) are incubated for 4 h with serum of control rabbits (S<sub>CONT</sub>) and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (S<sub>INFLA</sub>) pretreated or not with U74389G. \*p<0.05 compared to H<sub>INFLA</sub> + S<sub>CONT</sub>. Vertical bars are s.e.m.



**Figure 7.** Effect of 21-aminosteroid U74389G on hepatic lipid peroxidation assessed by the formation of malondialdehyde when hepatocytes from control rabbits ( $H_{\text{CONT}}$ ) and from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction ( $H_{\text{INFLA}}$ ) are incubated for 4 h with serum of control rabbits ( $S_{\text{CONT}}$ ) and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction ( $S_{\text{INFLA}}$ ) in presence or absence of in vivo pretreatment with U74389G. \*  $p < 0.05$  compared to  $H_{\text{CONT}}$  or  $H_{\text{INFLA}}$  incubated with  $S_{\text{CONT}}$ ,  $S_{\text{INFLA}}$ ,  $S_{\text{CONT}} + \text{U74389G}$  and  $S_{\text{INFLA}} + \text{U74389G}$ ; &  $p < 0.05$  compared to mean values estimated in  $H_{\text{CONT}}$ ; §§  $p < 0.05$  compared with  $S_{\text{CONT}}$  and  $S_{\text{INFLA}} + \text{U74389G}$ . Vertical bars are s.e.m



**Figure 8.** Effect of 21-aminosteroid U74389G on the production of theophylline metabolites, 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) when hepatocytes from control rabbits pretreated with U74389G (H<sub>CONT</sub> + U74389G) are incubated for 4 h with serum of control rabbits (S<sub>CONT</sub>) and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (S<sub>INFLA</sub>) pretreated or not with U74389G. Vertical bars are s.e.m.



**Figure 9.** Effect of 21-aminosteroid U74389G on the production of theophylline metabolites, 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) when hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction pretreated with U74389G (H<sub>INFLA</sub> + U74389G) are incubated for 4 h with serum of control rabbits (S<sub>CONT</sub>) and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (S<sub>INFLA</sub>) pretreated or not with U74389G. Vertical bars are s.e.m.

**Table II.** Effect of the 21-aminosteroid U74389G on the biotransformation of theophylline to 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) and lipid peroxidation in hepatocytes from control rabbits or rabbits with a turpentine-induced acute inflammatory reaction (TIAIR) receiving or not U74389G and incubated for 24 h with serum from control rabbits or rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction receiving or not U74389G.

	3MX	1MU ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,3DMU	Malondialdehyde (nmol/mg protein)
Hepatocytes from control rabbits receiving vehicle				
S <sub>CONT</sub>	0.15 $\pm$ 0.004	0.19 $\pm$ 0.012	4.52 $\pm$ 0.142	0.12 $\pm$ 0.007
S <sub>INFLA</sub>	0.14 $\pm$ 0.005	0.12 $\pm$ 0.011*	3.58 $\pm$ 0.223 <sup>@</sup>	0.16 $\pm$ 0.004*
S <sub>CONT+U74389G</sub>	0.14 $\pm$ 0.004	0.18 $\pm$ 0.012	4.00 $\pm$ 0.078	0.12 $\pm$ 0.005
S <sub>INFLA+U74389G</sub>	0.15 $\pm$ 0.006	0.20 $\pm$ 0.011	4.31 $\pm$ 0.199	0.12 $\pm$ 0.005
Hepatocytes from control rabbits receiving U74389G				
S <sub>CONT</sub>	0.14 $\pm$ 0.003	0.17 $\pm$ 0.008	4.15 $\pm$ 0.135	0.12 $\pm$ 0.006
S <sub>INFLA</sub>	0.14 $\pm$ 0.002	0.15 $\pm$ 0.003	3.96 $\pm$ 0.077	0.12 $\pm$ 0.003
S <sub>CONT+U74389G</sub>	0.14 $\pm$ 0.003	0.17 $\pm$ 0.008	4.09 $\pm$ 0.121	0.12 $\pm$ 0.006
S <sub>INFLA+U74389G</sub>	0.15 $\pm$ 0.003	0.16 $\pm$ 0.007	3.87 $\pm$ 0.259	0.11 $\pm$ 0.006
Hepatocytes from rabbits with TIAIR receiving vehicle				
S <sub>CONT</sub>	0.05 $\pm$ 0.001	0.11 $\pm$ 0.005	2.21 $\pm$ 0.079	0.22 $\pm$ 0.007
S <sub>INFLA</sub>	0.04 $\pm$ 0.002*	0.07 $\pm$ 0.001*	1.46 $\pm$ 0.024*	0.24 $\pm$ 0.006*
S <sub>CONT+U74389G</sub>	0.05 $\pm$ 0.003	0.10 $\pm$ 0.004	2.22 $\pm$ 0.073	0.20 $\pm$ 0.004
S <sub>INFLA+U74389G</sub>	0.05 $\pm$ 0.002	0.10 $\pm$ 0.009	2.15 $\pm$ 0.098	0.22 $\pm$ 0.007
Hepatocytes from rabbits with TIAIR receiving U74389G				
S <sub>CONT</sub>	0.14 $\pm$ 0.004	0.17 $\pm$ 0.008	4.25 $\pm$ 0.037	0.13 $\pm$ 0.003
S <sub>INFLA</sub>	0.13 $\pm$ 0.003	0.15 $\pm$ 0.002	4.15 $\pm$ 0.037	0.13 $\pm$ 0.005
S <sub>CONT+U74389G</sub>	0.13 $\pm$ 0.002	0.16 $\pm$ 0.004	4.16 $\pm$ 0.054	0.12 $\pm$ 0.004
S <sub>INFLA+U74389G</sub>	0.14 $\pm$ 0.004	0.17 $\pm$ 0.007	4.18 $\pm$ 0.064	0.13 $\pm$ 0.005

\*  $p < 0.01$  compared to S<sub>CONT</sub>, S<sub>CONT + U74389G</sub> and S<sub>INFLA + U74389G</sub>

<sup>@</sup>  $p < 0.05$  compared to S<sub>CONT</sub> and S<sub>INFLA + U74389G</sub>

S<sub>CONT</sub>, S<sub>INFLA</sub>, S<sub>CONT + U74389G</sub>, and S<sub>INFLA + U74389G</sub> are serum from control rabbits and from rabbits with a TIAIR without or with pretreatment with U74389G.

## Discussion

In the rabbit, turpentine-induced inflammatory reaction reduces the rate of biotransformation of theophylline by decreasing the expression of CYP1A1 and 1A2, and in addition it down-regulates CYP3A6 (Kurdi et al., 1999). *In vivo*, pretreatment of rabbits with the 21-aminosteroid U74389G prevents the decrease in rate of biotransformation of theophylline as well as the increase in intrahepatic lipid peroxidation (Galal and du Souich, 1999). The present results extend these observations showing that pretreatment of the rabbits with U74389G prevents the down-regulation of CYP1A1 and 1A2; moreover, U74389G increases the expression of CYP3A6 in hepatocytes from control rabbits as well as from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction.

To date, little is known about the mechanisms underlying the pre-translational down-regulation of P450 isoforms. Cells respond to inflammatory stimuli by selectively expressing a wide range of genes. These proinflammatory signals bind to receptors and initiate intracellular signalling cascades, which result in the activation of proinflammatory deoxyribonucleic acid-binding proteins such as activator protein-1 (AP-1) or nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), or increases in expression of the proto-oncogene *c-myc* (Rahman, 2000; Hirano et al, 2000; Karin and Chang, 2001). Hepatic cytochrome P450 down-regulation by turpentine-induced inflammatory reaction is IL-6-dependent (Bleau et al., 2000; Siewert et al., 2000), and IL-6 is known to activate AP-1 (Leu et al., 2001), NF- $\kappa$ B (Meng et al., 2001), and *c-myc* (Daino et al., 2000). These proteins can modulate expression and activity of P450 isoforms, specifically

AP-1 can modulate the expression of P450 isoforms of the CYP1A subfamily, but it is believed to increase the expression of CYP1A2 (Quattrochi et al., 1998). The transcription factor NF- $\kappa$ B is a negative regulatory element of CYP2B1/2 and CYP2C11 (Lee et al., 2000; Iber et al., 2000). The overexpression of c-myc induced by IL-2 down-regulates CYP1A1, CYP2B1/2, CYP2C11, CYP2D1, and CYP3A (Tinel et al., 1999).

*In vivo*, in this study U74389G prevents the down-regulation of CYP1A1 and 1A2 produced by the turpentine inflammatory reaction by two distinct mechanisms. Firstly, the fact that *in vitro*  $S_{\text{INFLA}} + \text{U74389G}$  does not decrease P450 activity in  $H_{\text{INFLA}}$  indicates that pretreatment with U74389G prevents the release of the serum mediator. In the turpentine-induced inflammatory reaction, the primary serum mediator is IL-6 (Bleau et al., 2000; Siewert et al., 2000) and it has been shown that U74389G reduces the synthesis of IL-6 (Lorenzl et al., 1995), supporting that U74389G may have prevented the effect of  $S_{\text{INFLA}}$  by inhibiting the release of IL-6. Secondly, the present results support that U74389G must also elicit an effect at the cellular level: a) by its antioxidant effects, blocking the activation of signal transduction pathways (Villa and Gorini, 1997), b) by impeding the activation of NF- $\kappa$ B (Fukuma et al., 1999; Okada et al., 2000), or c) by reducing the expression of c-myc (He and Na, 2001). Incubation of  $H_{\text{CONT}}$  with  $S_{\text{INFLA}}$  for 4 h increases lipid peroxidation without decreasing the output of theophylline metabolites. Moreover, in  $H_{\text{INFLA}}$  of rabbits pretreated with U74389G ( $H_{\text{INFLA}} + \text{U74389G}$ ) the addition of  $S_{\text{INFLA}}$  does not reduce the biotransformation of theophylline but still increases intrahepatic lipid peroxidation. These results suggest

that U74389G prevents the decrease in P450 activity by a mechanism independent of its antioxidant effects.

*In vitro*,  $S_{\text{INFLA}}$  incubated for 4 or 24 h with  $H_{\text{INFLA}}$  decreased the activity of CYP1A1 and 1A2 mainly secondary to a reduction in activity and not the quantity of these isoforms. The observation that the  $S_{\text{INFLA}}$  did not further down-regulate the expression of CYP1A1 and 1A2 proteins in  $H_{\text{INFLA}}$  following 24 h of incubation is in agreement with the fact that the serum mediator IL-6 reduces preferentially the expression of CYP3A6 (Muntané-Relat et al., 1995).

There is evidence supporting that under the present experimental conditions, P450 decrease in activity is associated to the presence of nitric oxide ( $\text{NO}^\bullet$ ) and possibly other oxygen reactive species (El-Kadi et al., 2000; Barakat et al., 2001).  $\text{NO}^\bullet$  can inactivate P450 isoforms by several mechanisms, such as forming dissociable  $\text{NO}$ -P450 adducts, the ferric form of P450 decreases meanwhile the inactive five-coordinated ferrous nitrosyl form increases, adducts that inactivate the P450 reversibly or irreversibly without affecting the expression of P450 isoforms (Khatsenko et al., 1993; 1997; 1998). In addition,  $\text{NO}^\bullet$  can nitrate tyrosine residues in the proximity of the active site resulting in P450 inactivation (Janig et al., 1987; 1988). Probably the two mechanisms of inactivation are sequential, with an early binding to  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  and a later nitration of tyrosine residues (Park et al., 1999). Local tissue injury by turpentine activates the transcription factor  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (Bazel et al., 1999) and increases the expression of nitric oxide synthase-2 (NOS2) and the release of  $\text{NO}^\bullet$  in the hepatocyte (Freeswick et al., 1994). During inflammation, activation of  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  plays an important role in the induction of NOS2 and the production of  $\text{NO}^\bullet$  (Taylor et al.,

1998; Galea and feinstein, 1999). On the other hand, it has been shown that U74389G reduces the expression of NOS2 and production of NO<sup>•</sup> by inhibiting the activation and translocation of NF-κB (Fukuma et al., 1999). Taken together, we may speculate that U74389G prevented the serum-induced decrease in activity of P450 in the hepatocyte by inhibiting NF-κB translocation, and consequently overexpression of NOS2 and release of NO<sup>•</sup>. According to this hypothesis, the fact that S<sub>INFLA</sub> did not reduce P450 activity in control hepatocytes may be explained by low levels of expression of NOS2, in contrast with the high levels in primed hepatocytes.

It is of interest to note that U74389G not only prevented CYP3A6 down-regulation but also increased the expression of CYP3A6 even in presence of the turpentine inflammatory reaction. The expression of CYP3A6 is modulated by several nuclear receptors, such as constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, retinoid X receptor, hepatocyte nuclear factor 4, and glucocorticoid receptor (El-Sankary et al., 2000; Pascussi et al., 2000; Jover et al., 2001). The mechanism underlying CYP3A6 induction by 21-aminosteroids, such as U74389G, may not be direct, since contrary to other CYP3A6 inducers, such as dexamethasone, it does not bind or increase the expression of the glucocorticoid receptor (Gonzalez-Deniselle et al., 1996). There is no information concerning the effect of U74389G on constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, retinoid X receptor, and hepatocyte nuclear factor 4. However, being U74389G a pregnatriene derivative, we might speculate that U74389G activates pregnane X receptor which is able to bind dexamethasone, rifampicin, and numerous pregnane derivatives which are CYP3A4 inducers (Kliwer et al., 1998; Lehmann et al., 1998; Bertilsson et al., 1998).

In conclusion, *in vivo* pretreatment of rabbits with U74389G prevents P450 down-regulation triggered by a turpentine-induced inflammatory reaction. *In vitro* studies demonstrate that the mechanism of action underlying the effect of U74389G is double; on the one hand, it inhibits serum mediators and on the other hand, it prevents the activation of intracellular signal transduction pathways rather than acting as an antioxidant. Probably, by the same mechanism U74389G prevents the decrease in P450 activity produced by the serum mediators. Finally, U74389G is a potent inducer of CYP3A6.

## **Acknowledgements**

Supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP - 43925).

The technical assistance of Mrs Lucie Héroux is gratefully acknowledged.

## References

Ashton, F.W., Jamieson, J.C. and Friesen, A.D. (1970) Studies on the effect of inflammation on rat serum proteins. *Can. J. Biochem.*, **48**, 841-850.

Barakat M.M., El-Kadi A.O.S., du Souich P (2001) L-NAME prevents *in vivo* the inactivation but not the down-regulation of hepatic cytochrome p450 caused by an acute inflammatory reaction. *Life Sci.* **69**,1559-1571.

Bazel S, Andrejko KM, Chen J, Deutschman CS. Hepatic gene expression and cytokine responses to sterile inflammation: comparison with cecal ligation and puncture sepsis in the rat. *Shock* 1999 May;11(5):347-55.

Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L, Sydow-Backman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P, Berkenstam A 1998 Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12208–12213.

Bleau AM, Levitchi MC, Maurice H and du Souich P (2000) Different cytokines mediate *in vivo* the human viral- and the rabbit turpentine-induced inflammation inactivation of hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol* **130**:1777-1784.

Braugher JM, Pregenzer JF, Chase RL, Duncan LA, Jacobsen EJ and McCall JM (1987) Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* **262**:10438-10440.

Daino H, Matsumura I, Takada K, Odajima J, Tanaka H, Ueda S, Shibayama H, Ikeda H, Hibi M, Machii T, Hirano T, Kanakura Y. Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement of STAT3 degradation by proteasome pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells. *Blood* 2000 Apr 15;95(8):2577-85.

du Souich P, Hoen B, Saunier C, Hartemann D, Sautegeau A, Cornette A, Delorme N, Polu JM and Sadoul P (1989) Blood gas disturbances and theophylline disposition in patients with COLD with and without hypoxemia. *Chest* **95**:1028-1032.

El-Kadi AOS, Bleau AM, Dumont I, Maurice H and du Souich P (2000) Role of reactive oxygen intermediates in the decrease of hepatic cytochrome P450 activity by serum of humans and rabbits with an acute inflammatory reaction. *Drug Metab Dispos* **28**:1112-1120.

El-Kadi AOS, Maurice H, Ong H and du Souich P (1997) Down-regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of human and animal serum, and intrahepatic mediators. *Br J Pharmacol* **121**:1164-1170.

El-Sankary W, Plant NJ, Gibson GG and Moore DJ (2000) Regulation of the CYP3A4 gene by hydrocortisone and xenobiotics: role of the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Drug Metab Dispos* **28**:493-496.

Fisher M, Plante GM and Doyle EM (1993) Inhibition of inflammatory cell-mediated myelin oxidation and interleukin-1 beta generation by a 21-aminosteroid, U74500A. *J Neurol Sci* **119**:189-194.

Freeswick PD, Wan Y, Geller DA, Nussler AK, Billiar TR. Remote tissue injury primes hepatocytes for nitric oxide synthesis. *J Surg Res* 1994 Jul;57(1):205-9.

Fukuma K, Marubayashi S, Okada K, Yamada K, Kimura A, Dohi K. Effect of lazaroid U-74389G and methylprednisolone on endotoxin-induced shock in mice. *Surgery* 1999 Apr;125(4):421-30.

Galal A and du Souich P (1999) 21-aminosteroids prevent the down-regulation of hepatic cytochrome P450 induced by hypoxia and inflammation in conscious rabbits. *Br J Pharmacol* **128**:374-379.

Galea E, Feinstein DL. Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *FASEB J* 1999 Dec;13(15):2125-37.

Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Piroli GG, Lima AE, De Nicola AF. The 21-aminosteroid U-74389F increases the number of glial fibrillary acidic protein-expressing astrocytes in the spinal cord of control and Wobbler mice. *Cell Mol Neurobiol* 1996 Feb;16(1):61-72.

He Q, Na X. The effects and mechanisms of a novel 2-aminosteroid on murine WEHI-3B leukemia cells in vitro and in vivo. *Leuk Res* 2001 Jun;25(6):455-61.

Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000 May 15;19(21):2548-56.

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

Janig GR, Kraft R, Blanck J, Ristau O, Rabe H, Ruckpaul K. Chemical modification of cytochrome P-450 LM4. Identification of functionally linked tyrosine residues. *Biochimica and Biophysica Acta* 1987;916:512-523.

Janig GR, Kraft R, Rabe H, Makower A, Ruckpaul K. Comparative studies on the accessibility and functional importance of tyrosine residues in cytochrome P-450 isozymes. *Biomedical and Biochimica Acta* 1988;47:565-579.

Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ and Castell JV (2001) Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: a study using adenovirus-mediated antisense targeting. *Hepatology* **33**:668-675.

Karin M, Chang L. AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *J Endocrinol* 2001 Jun;169(3):447-51.

Khatsenko OG, Barteneva NS, de la Maza LM, Kikkawa Y. Role of nitric oxide in the inhibition of cytochrome P450 in the liver of mice infected with *Chlamydia trachomatis*. *Biochemical Pharmacology* 1998;55:1835-1842.

Khatsenko OG, Boobis AR, Gross SS. Evidence for nitric oxide participation in down-regulation of CYP2B1/2 gene expression at the pretranslational level. *Toxicological Letters* 1997;90:207-216.

Khatsenko OG, Gross SS, Rifkind AB, Vane JR. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 1993;90:11147-11151.

Kliwer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH, Perlmann T, Lehmann JM 1998 An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92:73-82

Kurdi J, Maurice H, El-Kadi AO, Ong H, Dalkara S, Belanger PM and du Souich P (1999) Effect of hypoxia alone or combined with inflammation and 3-methylcholanthrene on hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits. *Br J Pharmacol* **128**:365-73.

Kruger NJ (1994) Detection of polypeptides on immunoblots using secondary antibodies or protein A. In: *Methods of molecular biology* (Ed. Walker, J.M.), Vol. 32, pp. 215-226. Humana Press, Totowa, N.J., USA.

Lee SH, Wang X, DeJong J . Functional interactions between an atypical NF-kappaB site from the rat CYP2B1 promoter and the transcriptional repressor RBP-Jkappa/CBF1. *Nucleic Acids Res* 2000 May 15;28(10):2091-8.

Lehmann JM, Mckee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Lehmann JM 1998 The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 102:1016–1023

Leu JI, Crissey MA, Leu JP, Ciliberto G, Taub R. Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Mol Cell Biol* 2001 Jan;21(2):414-24.

Lorenzl S, Koedel U, Frei K, Bernatowicz A, Fontana A and Pfister HW (1995) Protective effect of a 21-aminosteroid during experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* **172**:113-118.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.

Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, Tweardy DJ. Essential role for IL-6 in postresuscitation inflammation in hemorrhagic shock. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 Feb;280(2):C343-51.

Miniati M, Cocci F, Monti S, Filippi E, Sarnelli R, Ferdeghini M, Gattai V and Pistolesi M (1996) Lazaroid U-74389F attenuates phorbol ester-induced lung injury in rabbits. *Eur Respir J* **9**:758-764.

Morgan ET (1997) Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* **29**:1129-1188.

Okada K, Marubayashi S, Fukuma K, Yamada K, Dohi K. Effect of the 21-aminosteroid on nuclear factor-kappa B activation of Kupffer cells in endotoxin shock. *Surgery* 2000 Jan;127(1):79-86.

Ohakawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.

Parent C, Bélanger PM, Jutras L and du Souich P (1992) Effect of inflammation on the rabbit hepatic cytochrome P-450 isoenzymes. Alterations in the kinetics and dynamics of tolbutamide. *J Pharmacol Exp Ther* **261**:780-787.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2000) Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **274**:707-713.

Park CS, Baek HM, Chung WG, Lee KH, Ryu SD, Cha YN. Suppression of flavin-containing monooxygenase by overproduced nitric oxide in rat liver. *Molecular Pharmacology* 1999;56:507-514.

Proulx M and du Souich P (1995b) Inflammation-induced decrease in hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits is accompanied by an increase in hepatic oxidative stress. *Res Commun Mol Path Pharmacol* **87**:221-236.

Proulx M, Maupoil V, Rochette L and du Souich P (1995a) Increase in antilipoperoxidant activity of plasma as a consequence of an inflammatory reaction induced by subcutaneous turpentine in the rabbit. *Free Radic Res* **23**:245-254.

Quattrochi LC, Shih H, Pickwell GV. Induction of the human CYP1A2 enhancer by phorbol ester. *Arch Biochem Biophys* 1998 Feb 1;350(1):41-8.

Rahman I. Regulation of nuclear factor-kappa B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 2000 Oct 15;60(8):1041-9.

Salahudeen A, Wang C, McDaniel O, Lagoo-Denadyalan S, Bigler S and Barber H (1996) Antioxidant lazaroid U-74006F improves renal function and reduces the expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and MHC antigens in a syngeneic renal transplant model. Partial support for the response-to-injury hypothesis. *Transplantation* **62**:1628-1633.

Sarkar, M.A. and Jackson, B.J. (1994). Theophylline demethylations as probes for P4501A1 and P4501A2. *Drug Metab. Dispos.*, **22**, 827-834.

Seglen PO (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* **13**:29-83.

Semrad SD, Rose ML and Adams JL (1993) Effect of tirilazad mesylate (U74006F) on eicosanoid and tumor necrosis factor generation in healthy and endotoxemic neonatal calves. *Circ Shock* **40**:235-242.

Siewert E, Bort R, Kluge R, Heinrich PC, Castell J, Jover R. Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent. *Hepatology* 2000 Jul;32(1):49-55.

Smith BJ (1994) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: *Methods of molecular biology* (Ed. Walker, J.M.), Vol. 32, pp. 23-34. Humana Press, Totowa, N.J., USA.

Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc)* 1998 Jul;63(7):766-81.

Thorpe GHG, Kricka LJ, Moseley SB and Whitehead TP (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* 31:1335-1341

Tinel M, Elkahwaji J, Robin MA, Fardel N, Descatoire V, Haouzi D, Berson A, Pessayre D. Interleukin-2 overexpresses c-myc and down-regulate cytochrome P-450 in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1999

Villa RF, Gorini A. Pharmacology of lazaroids and brain energy metabolism: a review. *Pharmacol Rev* 1997 Mar;49(1):99-136.

## **DISCUSSION**

## Discussion

Chez l'homme, les infections virales et bactériennes de même qu'une réaction inflammatoire, entraînent une diminution de la clairance de médicaments tels que la théophylline, secondairement à une réduction de l'activité des isoformes du cytochrome P450 hépatique. La réduction de la biotransformation hépatique d'un médicament est liée à une augmentation de ses concentrations plasmatiques, ce qui peut causer une toxicité même lorsque des doses thérapeutiques de ce médicament sont administrées. Par conséquent, la connaissance des mécanismes sous-jacents à la diminution du métabolisme hépatique lors d'une réaction inflammatoire est essentielle afin de diminuer l'incidence des effets secondaires et d'instaurer des stratégies pour améliorer le traitement des patients.

Chez le lapin, une réaction inflammatoire aiguë peut être produite par l'administration sous-cutanée de térébenthine. De fait, il a été observé qu'*in vivo*, 48 heures après avoir induit une réaction inflammatoire aiguë chez le lapin, la clairance métabolique de la théophylline est diminuée secondairement à la répression des isoenzymes 1A1, 1A2 et 3A6 du P450 hépatique (Kurdi et coll., 1999). De plus, *in vitro*, le sérum de lapins avec une RIA et le sérum d'humains atteints d'une infection virale des voies respiratoires supérieures sont capables de diminuer l'activité catalytique des isoenzymes 1A1 et 1A2 des hépatocytes de lapin avec une RIA (El-Kadi et coll., 1997). Les mécanismes d'action de cette diminution d'activité et de la répression des isoformes du P450 demeurent inconnus, mais les substances oxygénées réactives

(SOR) produites lors d'une réaction inflammatoire aiguë ont été impliquées dans la diminution de l'activité et de la quantité du P450 hépatique (Proulx et coll., 1995b).

Des études antérieures dans notre laboratoire ont démontré qu'*in vivo* le pré-traitement de lapins avec un dérivé des 21-aminostéroïdes, le U74389G, confère une protection totale de façon que la RIA n'affecte pas le P450. De plus, le U74389G empêche l'augmentation de la peroxydation lipidique intrahépatique provoquée par une réaction inflammatoire aiguë (Galal et du Souich, 1999). À la lumière de ces résultats expérimentaux, nous voulions élucider le mécanisme par lequel l'U74389G empêche la diminution du P450 de lapins avec une réaction inflammatoire induite par l'injection de térébenthine.

Les résultats de la présente étude suggèrent que le U74389G agit à deux niveaux, premièrement, en inhibant/diminuant la libération de médiateurs sériques pro-inflammatoires et deuxièmement en modifiant la réactivité de l'hépatocyte au  $S_{INFLA}$ .

La réaction inflammatoire est un phénomène complexe résultant d'un dommage tissulaire causé par des facteurs endogènes ou exogènes. Ce processus est initié par l'activation des cellules inflammatoires (e.g. les macrophages et les neutrophiles) présentes au siège de l'inflammation et conduit à la production d'une variété de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et des facteurs chimiotactiques. Ces substances, à leur tour, stimulent la synthèse de cytokines de seconde phase telles que l'IL-6. Les cytokines ainsi libérées peuvent se disséminer dans l'organisme via la circulation sanguine et atteindre leurs organes

cibles, comme le foie, où elles modulent l'expression de plusieurs gènes (Koj, 1996; Moshage, 1997).

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont proposé que les cytokines pro-inflammatoires notamment, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$ , contribuent à la diminution de l'activité et de la quantité du P450 hépatique (Chen et coll., 1992; Calleja et coll., 1997). Ces cytokines semblent agir principalement au niveau transcriptionnel (Morgan, 1997). Parmi ces cytokines, l'IL-6 joue le rôle le plus important en ce qui concerne l'induction de l'expression des protéines de la phase aiguë (Heinrich et coll., 1990; Geiger et coll., 1988; Castell et coll., 1989). De plus, plusieurs études démontrent que l'IL-6 est le médiateur sérique primordial responsable de la diminution de l'activité et de la quantité du cytochrome P450 observée suite à l'administration s.c. de térébenthine. Fukuda et ses collaborateurs ont rapporté que l'expression constitutive de l'ARNm des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A4 était réduite par l'IL-6 dans des lignées cellulaires d'hépatocarcinomes humains (1992). Par ailleurs, la présence des éléments de réponse de l'IL-6 dans la région 5' flanquante des gènes des CYP1A1/CYP1A2 suggère que l'IL-6 joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle de ces gènes (Abdel Razzak et coll., 1993). Siewart et ses collaborateurs (2000) ont démontré que la diminution des niveaux d'ARNm des CYP1A2, CYP2A5 et CYP3A11 lors d'une RIA induite par l'injection de térébenthine est abolie chez les rats génétiquement déficients en IL-6. Finalement, il a été démontré par immunoneutralisation en présence d'anticorps anti-IL-6 que le S<sub>INFLA</sub> ne diminue pas l'activité des CYP1A1 et 1A2 de H<sub>INFLA</sub> (Bleau et coll., 2000). Ces résultats

confirment que l'IL-6 est indispensable à la répression du P450 hépatique observée lors d'une inflammation aseptique.

L'IL-6 libérée suite à l'induction d'une réaction inflammatoire se lie à son récepteur à la surface des hépatocytes et déclenche ainsi plusieurs voies de signalisation intracellulaire. La liaison de l'IL-6 à la sous-unité gp130 du complexe récepteuriel entraîne l'homodimérisation du gp130 ainsi qu'une hétérodimérisation avec d'autres récepteurs du même type, ce qui résulte en une activation des kinases de type Janus (JAK1, JAK2 et TYK2) (Lutticken et coll., 1994; Stahl et coll., 1994). Par la suite, le gp130 est phosphorylé sur ses résidus tyrosine et peut ainsi recruter des molécules de signalisation telles que le SHP2 (protéine tyrosine phosphatase 3) et le STAT3 (Akira et coll., 1994; Fukada et coll., 1996; Yamanaka et coll., 1996). Suite à la phosphorylation de ses résidus tyrosine, le STAT3 peut former un homodimère ou un hétérodimère avec STAT1 et entrer dans le noyau où il régule l'expression d'une série de gènes spécifiques (Darnell, 1997; Darnell et coll., 1994; Ihle, 1996; Hirano et coll., 1997). Le STAT3 peut ainsi induire l'expression des gènes des protéines de la phase aiguë (PPA) et le gène du facteur transcriptionnel c-myc (Kim et Baumann, 1999). D'autre part, l'IL-6 peut activer la cascade des MAPK (Kim et Baumann, 1999) et augmenter l'expression du NF- $\kappa$ B (Middleton et coll., 2000; Kovalovich et coll., 2000). Les études révèlent également que l'IL-6 peut activer l'expression des gènes hépatiques via la stimulation du facteur transcriptionnel AP-1 (c-Jun, c-Fos). En effet, l'AP-1 peut interagir avec STAT-3 dans le noyau pour augmenter la transcription génétique (Leu et coll., 2001).

Le NF- $\kappa$ B est le facteur transcriptionnel le mieux caractérisé en tant qu'activateur de l'expression génétique pendant des réactions inflammatoires et immunologiques (Ghosh et May, 1998). Ce facteur ubiquitaire est impliqué dans la régulation positive de plusieurs gènes pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , le NOS2, l'IL-1, l'IL-6 et l'ICAM-1 (Baeuerle et coll., 1994). Le NF- $\kappa$ B fait partie d'une famille de protéines appelée Rel et réside dans le cytoplasme dans un état inactif complexé avec une protéine inhibitrice i.e. l'I $\kappa$ -B (Baeuerle et Baltimore, 1988). Suite à l'exposition de la cellule au LPS ou à des cytokines comme l'IL-6, l'I $\kappa$ -B est phosphorylé et dégradé permettant ainsi au NF- $\kappa$ B de se libérer, de migrer au noyau et de déclencher la transcription des gènes (Galea et coll., 1999).

La revue de la littérature révèle que des facteurs transcriptionnels tels que le NF- $\kappa$ B, l'AP-1 et le c-myc sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes du cytochrome P450 suite à la stimulation des cellules avec des cytokines. Par exemple, Iber et ses collaborateurs (2000) ont observé que le NF- $\kappa$ B exerce un effet répresseur sur l'expression du *CYP2C11* suite à la stimulation avec l'IL-1. Ces investigateurs ont démontré qu'effectivement le NF- $\kappa$ B peut se lier à son élément de réponse (le  $\kappa$ B-RE1) en amont du gène *CYP2C11* et inhiber de cette façon la transcription de ce gène par des cytokines pro-inflammatoires. Cette répression de la transcription peut s'expliquer par le fait que la liaison du NF- $\kappa$ B au  $\kappa$ B-RE1 pourrait inhiber l'assemblage et/ou le déplacement du complexe de l'ARN polymérase II. Le NF- $\kappa$ B pourrait également inhiber la liaison de coactivateurs transcriptionnels ou recruter lui-même des corépresseurs transcriptionnels (Iber et coll., 2000). Part ailleurs, il a aussi

été montré que le NF- $\kappa$ B peut également réprimer la transcription de *CYP2B1* et *CYP2B2* (Lee et coll., 2000).

En ce qui concerne l'AP-1, les résultats de l'étude de Quattrochi et ses collaborateurs (1998) montrent que les membres de la famille des facteurs transcriptionnels AP-1 tels que c-Jun, JunD et c-Fos peuvent se lier aux séquences régulatrices du *CYP1A2* et activer la transcription de ce gène.

Quant au c-myc, Tinel et ses collaborateurs (1999) rapportent, dans leur étude, que l'IL-2 cause une surexpression du c-myc et une répression des isoenzymes *CYP1A1*, *2B1/2*, *2C11*, *2D1* et *3A* dans des hépatocytes de en culture de rat.

Nos travaux démontrent qu'*in vitro*, le sérum de lapin avec une réaction inflammatoire ( $S_{INFLA}$ ) inactive le P450 d'hépatocytes de lapin avec une RIA après 4 h et 24 h d'incubation, résultats qui sont en accord avec les travaux effectués antérieurement dans notre laboratoire par l'équipe d'El-Kadi et collaborateurs (1997) et Bleau et collaborateurs (2001). La diminution de l'activité des isoformes du P450 a été associée à la présence du NO $\cdot$  dans les hépatocytes, une hypothèse qui est en accord avec les résultats de plusieurs études. La réduction de l'activité du P450 en réponse à un traitement *in vivo* avec le LPS a été associée à une surproduction de NO (Khatsenko et coll., 1993). Wink et ses collaborateurs (1993) ont observé *in vitro* une inhibition de l'activité du P450 dans les microsomes exposés au NO $\cdot$  et à des agents qui libèrent le NO $\cdot$ . Le NO $\cdot$  a également été largement impliqué dans l'inhibition de l'activité de *CYP1A* et *CYP2B* chez des souris infectées avec le *Chlamydia trachomatis*

(Khatsenko et coll., 1998). Finalement, les résultats publiés par Barakat et ses collaborateurs (2001) montrent qu'*in vivo* l'administration du L-NAME (un inhibiteur spécifique de NOS2) prévient partiellement l'inactivation mais pas la diminution des isoenzymes 1A1 et 1A2 observée lors d'une réaction inflammatoire aiguë induite par l'injection de térébenthine. Ceci a conduit ces investigateurs à conclure que le NO<sup>•</sup> est en partie responsable de la diminution de l'activité catalytique des CYP1A1 et CYP1A2 lors d'une RIA.

Tel que discuté précédemment, une réaction inflammatoire locale induite par la térébenthine peut activer l'expression du NF-κB qui stimule à son tour l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (NOS2) (Freeswick et coll., 1994). La NOS synthétisée peut catalyser la formation d'importante quantité de NO<sup>•</sup> dans les hépatocytes. Il a de plus été rapporté que le CYP3A6 contribue également à la production de NO<sup>•</sup> dans les hépatocytes de lapin avec une RIA (Barakat et coll., 2001).

Théoriquement, le NO<sup>•</sup> pourrait inhiber l'activité enzymatique des isoformes du P450 par plusieurs mécanismes. (1) Il a été démontré que le NO<sup>•</sup> se lie à la partie hémique des enzymes du P450 avec une grande affinité (Ebel et coll., 1975, Khatsenko et coll., 1993) et que les complexes NO<sup>•</sup>/P450 sont relativement instables (Ebel et coll., 1975). La liaison du NO<sup>•</sup> à l'atome de fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) qui se trouve au centre prosthétique du cytochrome P450 empêche la fixation de l'oxygène à ce site et entraîne ainsi une inhibition réversible de l'activité enzymatique du P450 hépatique sans affecter son expression (Khatsenko et coll., 1993; Stadler et coll., 1994; Kim et coll., 1995). (2) La

nitration des résidus tyrosine situés à proximité du centre catalytique du P450 résulte en une inactivation irréversible de cette enzyme. Ceci est dû au fait que cette nitration interfère avec le transfert des électrons à partir du cytochrome P450 NADPH-réductase au cytochrome P450 (Jänig et coll., 1987). Il est également plausible que ces deux mécanismes d'inactivation soient séquentiels où on assisterait d'abord à la fixation du  $\text{NO}^\bullet$  au fer ferreux du P450 et ensuite à la nitration des résidus tyrosine (Park et coll., 1999).

L'inactivation du cytochrome P450 pourrait se réaliser également par le biais des substances oxygénées réactives telles que le  $\text{H}_2\text{O}_2$ , le radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , le radical  $\text{OH}^\bullet$  et le  $\text{NO}^\bullet$ . Effectivement, les résultats de notre étude sur la peroxydation lipidique démontrent qu'*in vitro*, le  $\text{S}_{\text{INFLA}}$  augmente significativement la concentration de malondialdéhyde dans les hépatocytes témoins et dans les hépatocytes de lapin avec une RIA ( $\text{H}_{\text{INFLA}}$ ) après une période d'incubation de 4 h et 24 h. De fait, la réaction inflammatoire aiguë induite par la térébenthine provoque un stress oxydatif hépatique caractérisé par une diminution de l'activité des piègeurs enzymatiques, une diminution du GSH ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique (Proulx et du Souich, 1995b). De plus, il a été montré que la diminution de l'activité et de la quantité du P450 hépatique dans les  $\text{H}_{\text{INFLA}}$  est associée à la présence de SOR générées par le  $\text{S}_{\text{INFLA}}$  suite à 4 heures d'incubation. L'effet du  $\text{S}_{\text{INFLA}}$  est prévenu de façon dose-dépendante par le L-NAME ou par les antioxydants tels que la N-acétylcystéine et la diméthylthiourée et potentialisé par les inhibiteurs de la superoxyde dismutase, de la catalase et du glutathione peroxydase (El-Kadi et coll., 2000).

En tenant compte de la diversité de médiateurs sériques produits lors d'une réaction inflammatoire, diverses sources de SOR sont possiblement impliquées telles que la NADPH oxydase membranaire et cytosolique, la xanthine oxydase, la chaîne respiratoire mitochondriale et le système du P450 lui-même. Concernant le système de la NADPH oxydase, l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et l'IFN- $\gamma$  peuvent activer la phospholipase A2 (McPhail et coll., 1993) pour produire l'acide arachidonique qui est ensuite transformé en leucotriène par la 5-lipoxygénase, réaction qui génère des SOR (Rhee, 1999). Par ailleurs, les cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 sont capables d'activer la xanthine oxydase pour générer le radical  $O_2^{\bullet-}$  (Ghezzi et coll., 1985). La réaction inflammatoire induite par la térébenthine augmente l'activité de la xanthine oxydase qui est également une source importante de SOR (Proulx et du Souich, 1995b).

En réponse à différents stimuli inflammatoires comme la septicémie, les cytokines ou la céramide, les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale peuvent produire des SOR qui servent de seconds messagers pour activer des facteurs transcriptionnels tels que le NF- $\kappa$ B et le c-myc et stimuler l'expression de la NOS2 (France-Lanord, et coll., 1997; Duranteau et coll., 1998; Rosenfeld, 1998). De plus, dans les hépatocytes, l'IFN- $\gamma$  (Ghezzi et coll., 1985, 1986), l'IL-1 $\beta$  (Kocic et coll., 1995), le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Pfeffer et coll., 1994) peuvent activer la xanthine oxydase et ainsi produire l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) qui induit l'expression du c-myc (Singh et Aggaewal, 1995) et du NF- $\kappa$ B (Li et coll., 1997; Rusyn et coll., 1998; Lee et coll., 1999; Wang et coll., 1999).

Finalement, il a été démontré dans des hépatocytes que plusieurs isoformes du P450 sont capables de générer des SOR (Serino et coll., 1993), plus spécifiquement, le CYP2E1 génère le  $H_2O_2$  (Gergel et coll., 1997); les CYP3A4, 1A1, 1A2 et 2B6 produisent l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Puntarula et Cederbaum, 1998) et le CYP3A génère le  $NO^{\bullet}$  (Kuo et coll., 1995).

Les SOR peuvent affecter l'activité et la quantité des isoformes du P450 de plusieurs façons. 1) elles peuvent affecter directement les isoenzymes du P450 et réduire leur activité (Khatsenko et coll., 1993; Eliasson et coll., 1994; Karuzina et Archakov; 1994). Par exemple, il a été rapporté que l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) est capable de réduire l'activité de CYP1A1 (Flowers et Miles, 1991). 2) les SOR peuvent réduire indirectement l'activité de CYP1A et CYP3A en induisant la phosphorylation de ces isoformes (Quillet-Mary et coll., 1997; Korsmeyer et coll., 1999; Pyerin et coll., 1987). 3) les SOR peuvent déprimer le P450 en modifiant l'expression du NF- $\kappa$ B et du c-myc (Bonizzi et coll., 1999; Flescher et coll., 1998; Gergel et coll., 1997). De fait, les SOR (particulièrement le radical  $OH^{\bullet}$ ) sont capables d'activer le NF- $\kappa$ B de même que les homo-/hétérodimères de c-Jun et c-Fos qui stimulent l'expression des gènes de cytokines (Devary et coll., 1991; Schrech et coll., 1991; Altavilla et coll., 1998)

Dans la présente étude, nous avons démontré *in vivo* que le prétraitement de lapins avec l'U74389G pendant 72 heures a prévenu la diminution du métabolisme de la théophylline et la réduction de la quantité de CYP1A1 et CYP1A2 induite par la réaction inflammatoire aiguë. Nous constatons également que l'administration de l'U74389G aux lapins avec une RIA a prévenu l'augmentation de la concentration de

malondialdéhyde observée dans les  $H_{INFLA}$ . Nos résultats sont en parfaite concordance avec ceux publiés antérieurement par Galal et du Souich (1999) qui démontraient qu'*in vivo* l'administration de l'U74389G empêche la diminution de la clairance de la théophylline et l'augmentation de la peroxydation lipidique intrahépatique induites par une réaction inflammatoire aiguë.

Nos résultats démontrent que le dérivé des 21-aminostéroïdes, le U74389G, empêche la régulation négative du P450 induite par une RIA par un mécanisme mixte. D'abord, le sérum de lapin avec une RIA recevant le U74389G ( $S_{INFLA+U74389G}$ ) n'inhibe pas l'activité *in vitro* du P450 dans les  $H_{INFLA}$ . Donc, nous pouvons affirmer que l'U74389G a inhibé la formation/libération de médiateurs sériques pro-inflammatoires. En accord avec notre hypothèse, il a été démontré que l'U74389G est capable d'inhiber la production de l'IL-6 dans les macrophages péritonéaux stimulés par des cytokines ou le LPS (Lorenzl et coll., 1995). L'U74389G bloque également la formation de l'IL-6 dans les cellules de Kupffer stimulées par le LPS (Okada et coll., 2000). Les résultats rapportés par Shenkar et Abraham (1995) démontrent que le traitement de rats avec l'U74389G a atténué les niveaux d'ARNm de l'IL-6. Par ailleurs, les 21-aminostéroïdes suppriment l'expression de l'IL-1, l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  dans les cellules mononucléaires pulmonaires (Salahudeen et coll., 1996). Basés sur ces résultats, nous pouvons postuler que l'U74389G a empêché l'effet dépresseur du  $S_{INFLA}$  en bloquant la synthèse de l'IL-6 qui est la principale cytokine responsable de la répression du P450 lors d'une RIA.

D'autre part, nos résultats montrent qu'*in vivo* l'activité du P450 n'est pas modifiée par la RIA lorsque des lapins sont traités avec l'U74389G. De plus, le  $S_{INFLA}$  ne diminue pas l'activité du P450 dans les hépatocytes de lapin avec une RIA recevant le U74389G ( $H_{INFLA+U74389G}$ ). Ces observations suggèrent que l'U74389G exerce également un effet protecteur sur les hépatocytes. Le mécanisme de cette protection pourrait dépendre de l'inhibition de l'activation du NF- $\kappa$ B dans les hépatocytes. Effectivement, l'U74389G réduit substantiellement l'activation du NF- $\kappa$ B dans le foie de souris traitées avec le LPS (Fukuma et coll., 1999). L'inhibition du NF- $\kappa$ B dans les cellules de Kupffer s'explique par une inhibition de la dégradation des protéines I $\kappa$ B $\alpha$  et I $\kappa$ B $\beta$  (Okada et coll., 2000). Le U74389G pourrait agir via un effet antioxydant et ainsi empêcher l'activation des voies de signalisation (Villa et Gorini, 1997). Finalement, le U74389G pourrait exercer son effet en réprimant l'expression du c-myc (He et Na, 2001).

Concernant les résultats que nous avons obtenus sur la peroxydation lipidique, nous constatons d'une part que l'incubation du  $S_{INFLA+U74389G}$  pendant 4 heures avec les hépatocytes de lapins avec une réaction inflammatoire aiguë n'augmente pas la quantité de malondialdéhyde (MDA) intrahépatique. De même, la quantité de malondialdéhyde n'est pas modifiée lorsque le  $S_{INFLA}$  est incubé avec des hépatocytes de lapins recevant le U74389G ( $H_{CONT+U74389G}$ ). Cependant, une augmentation légère mais significative de la concentration de malondialdéhyde a été notée lorsque le  $S_{INFLA}$  est ajouté aux hépatocytes de lapins avec une RIA recevant le lazaroïde ( $H_{INFLA+U74389G}$ ). Ces résultats permettent donc de conclure que l'U74389G a prévenu

la diminution de l'activité du P450 par un mécanisme autre que son action antioxydante.

*In vivo*, la diminution de la quantité de MDA dans les  $H_{INFLA+U74389G}$  par rapport à celle des  $H_{INFLA}$  peut être associée à l'effet antioxydant du U74389G. De fait, les 21-aminostéroïdes sont de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique et de la production de dérivés réactifs de l'oxygène par les cellules polymorphonucléaires et les monocytes humains (Braugher et coll., 1987; Fisher et coll., 1990). Les lazaroïdes sont des composés lipophiles qui s'intercalent dans la membrane cellulaire réduisant ainsi la fluidité de la bicouche lipidique, ce qui a pour effet de stabiliser la membrane (Braugher et coll., 1987). Ainsi, les lazaroïdes parviennent à empêcher la mobilité des SOR dans la membrane lipidique et réduisent la propagation des réactions en chaîne (Braugher et coll., 1988). Plusieurs études démontrent que l'U74006 a la capacité de piéger le radical lipid peroxy, le  $OH^{\bullet}$ , le  $H_2O_2$  et le peroxy-nitrite (Braugher et Pagenzer, 1989; Horwitz et coll., 1996; Fici et coll., 1997). Par ailleurs, en plus d'une inhibition directe de la peroxydation des lipides, les lazaroïdes sont capables de réduire la production du radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) par les neutrophiles (Thomas et coll., 1993). Les 21-aminostéroïdes préviennent également la génération du radical superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en inhibant l'enzyme NADPH oxydase (Thomas et coll., 1993). Tous ces effets peuvent avoir contribué aux résultats observés dans notre étude.

L'inhibition de l'inactivation du P450 par l'U74389G peut être due au fait que ce lazaroïde est capable de réduire l'expression de la NOS2 et la production de  $NO^{\bullet}$  qui

en résulte en inhibant l'activation du NF- $\kappa$ B dans le foie (Fukuma et coll., 1999). D'ailleurs, Zhang et ses collaborateurs (1995) ont suggéré que l'effet anti-inflammatoire de l'U74389G dans l'endotoxémie est en partie attribuable à l'atténuation de la production de NO<sup>\*</sup> par ce lazaroïde. De même, Salahudeen et ses collaborateurs (1996) ont noté que l'administration de l'U74006 (qui a les mêmes propriétés pharmacologiques que l'U74389G) inhibait totalement l'augmentation de l'ARNm de la NOS2 dans les reins transplantés de rat.

Dans la présente étude, nous constatons que la réaction inflammatoire aiguë induite par la térébenthine chez le lapin a réduit le contenu protéique du CYP3A6 de 48%. Le prétraitement des lapins avec le U74389G a non seulement prévenu la diminution du CYP3A6 mais a également augmenté son expression dans des hépatocytes de lapin avec une réaction inflammatoire aiguë et recevant le U74389G.

L'expression de l'isoforme 3A6 peut être régulée par plusieurs récepteurs nucléaires tels que le récepteur constitutif de l'androstane, le PXR (pregnane X receptor), le récepteur des rétinoïdes X, le HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4) et le récepteur des glucocorticoïdes (El-Sankary et coll., 2000; Pascussi et coll., 2000; Jover et coll., 2001). Le PXR est un des membres de la superfamille de récepteurs qui inclue des récepteurs des stéroïdes/rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes. C'est un récepteur dit 'orphelin' qui se lie à un élément de réponse dans le promoteur du gène *CYP3A4*. De fait, le PXR est activé par une variété de médicaments et de stéroïdes capables d'induire l'expression du CYP3A4 (Lehmann et coll., 1998). Le HNF4 est un membre de la superfamille de récepteurs nucléaires et il est impliqué chez diverses

espèces dans l'activation des promoteurs de plusieurs P450. Jover et ses collaborateurs (2001) ont noté que le blocage de la traduction du HNF4 entraînait une diminution dose-dépendante des CYP3A4, CYP3A5 et CYP2D6 dans des hépatocytes humains en culture.

Dans la famille CYP3A, les CYP3A1, CYP3A3/4 et CYP3A6 semblent être les principales isoenzymes induites par les glucocorticoïdes dans des hépatocytes de rat, ainsi que dans des hépatocytes humains et de lapin (Wrighton et coll., 1985; Gonzalez et coll., 1986; Bork et coll., 1989). Les études démontrent que le récepteur des glucocorticoïdes (GR) joue un rôle aussi important que le PXR dans l'induction du gène *CYP3A4* en réponse à une stimulation directe par des glucocorticoïdes tels que la dexamétasone et l'hydrocortisone (Sankary et coll., 2000). En effet, Hashimoto et ses collaborateurs (1993) ont démontré la présence d'un élément de réponse aux glucocorticoïdes dans la région régulatrice du gène *CYP3A4*.

L'induction du CYP3A6 produite par le U74389G ne résulte pas d'un effet direct puisque les 21-aminostéroïdes ne se lient pas aux récepteurs des glucocorticoïdes classiques (Hall, 1987, 1993; Fleishaker et coll., 1993). Les effets possibles du U74389G sur le récepteur constitutif de l'androstane, le PXR, le récepteur des rétinoïdes (RXR) et le HNF4 sont inconnus à ce jour. Cependant, comme le U74389G est un dérivé pregnatriène, nous suggérons qu'il active le récepteur de pregnane X (PXR) qui est normalement activé par des substances telles que la rifampicine, le dexaméthasone et plusieurs autres dérivés de pregnanes qui sont considérés des

inducteurs de CYP3A4 (Bertilsson et coll., 1998; Kliewer et coll., 1998; Lehmann et coll., 1998 ).

## Conclusion

Les résultats de notre étude concordent avec ceux qui ont été rapportés par Galal et du Souich (1999) et qui démontrent que le prétraitement de lapins avec le U74389G prévient totalement la régulation négative du cytochrome P450 hépatique induite par une réaction inflammatoire aiguë.

Nous avons investigué chez des lapins avec une réaction inflammatoire aiguë le mécanisme par lequel l'U74389G produit cet effet. Notre étude démontre que l'administration i.v. de l'aminostéroïde U74389G empêche l'inactivation et la répression des isoformes 1A1 et 1A2 du cytochrome P450 hépatique induites par une réaction inflammatoire. De plus, nos études *in vitro* indiquent que le mécanisme d'action sous-jacent à cet effet protecteur de l'U74389G est double. D'une part, ce lazaroïde inhibe les médiateurs sériques pro-inflammatoires (tels que la cytokine IL-6) et d'autre part, il prévient l'activation des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans l'inactivation/répression du P450 hépatique. À ce niveau, le rôle de ses propriétés antioxydantes semble négligeable. Finalement, nous avons observé que l'U74389G est un inducteur enzymatique puissant du CYP3A6.

En sachant que le U74389G agit au niveau de l'hépatocyte et des médiateurs sériques, afin d'explorer le mécanisme d'action du U74389G, il serait intéressant d'évaluer l'effet du U74389G sur l'activation du NF- $\kappa$ B (Okada et coll. 2000) et l'expression de c-myc (Iber et coll., 2000; Tinel et coll., 1999) chez les lapins avec une RIA parce que ces facteurs de transcription ont été associés à la régulation négative du cytochrome

P450 lors d'une RIA. De plus, il conviendrait de documenter l'effet de ce lazaroïde sur les médiateurs sériques, principalement, l'IL-6.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## Bibliographie

**Abdel-Razzak, Z., Loyer, P., Fautrel, A., Gautier, J.C., Corcos, L., Turlin, B., Beaune, P., Guillouzo, A.,** *Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture.* Mol. Pharmacol. 1993;44:707-715.

**Althaus, J.S., Williams, C.M., Andrus P.K., Yonkers, P.A., Fici, G.J., Hall, E.D., Von Voigtlander, P.F. et Coll.,** *In vitro and in vivo analysis of tirilazad (U-74006F) as a hydroxyl radical scavenger.* Neurosci. Abstr. 1991;17:164.

**Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X.J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M., Kishimoto, T.,** *Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway.* Cell 1994;77:63-71

**Anari, M.R., Renton, K.W.,** *Modulatory effect of hyperthermia on hepatic microsomal cytochrome P450 in mice.* Biochem. Pharmacol. 1993;46:307-310.

**Angus, P.W., Ng, C.Y., Ghabrial, H., Morgan, D.J., Smallwood, R.A.,** *Effects of chronic left ventricular failure on hepatic oxygenation and theophylline elimination in the rat.* Drug Metab. Dispos. 1995;23:485-489.

**Antonini, M.J., Van Dyke, K., Dimatteo, M., Reasor, M.J.,** *Attenuation of acute inflammatory effects of silica in rat lung by 21-aminosteroid, U74389G.* Inflammation 1995;19:9-21.

**Baeuerle, P.A., Henkel, T.,** *Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system.* Annu. Rev. Immunol. 1994;12:141-179.

**Baeuerle, P.A., Baltimore, D.,** *I $\kappa$ B : a specific inhibitor of the NF- $\kappa$ B transcription factor.* Science 1988; 242:540-546.

**Bankers-Fulbright, J.L., Kalli, K.R., McKean, D.J.,** *Interleukin-1 signal transduction.* Life Sci. 1996;59:61-83.

**Barakat, M.M., El-Kadi, A.O.S., du Souich, P.,** *L-NAME prevents in vivo the inactivation but not the down-regulation of hepatic cytochrome P450 caused by an acute inflammatory reaction.* Life Sci. 2001;69:1559-1571.

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

**Barker, C.W., Fagan, J.B., Pasco, D.S.,** *Down-regulation of P450 1A1 and P450 1A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress.* J. Biol. Chem. 1994;269:3985-3990.

**Bass, N.M., Williams, R.L.,** *Guide to drug dosage in hepatic disease.* Clin. Pharmacokinet. 1988;15:396-420.

**Baumann, H., Gauldie, J.,** *Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation.* Mol. Biol. Med. 1990;7:147-159.

**Beck, F.J., Whitehouse, M.W.,** *Impaired drug metabolism in rats associated with acute inflammation : a possible assay for anti-injury agents.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1974;145:135-140.

**Bellward G.D., Chang, T., Rodrigues, B., McNeill, J.H., Maines, S., Ryan, D.E., Levin, W., Thomas, P.E.,** *Hepatic cytochrome P-450 induction in the spontaneously diabetic BB rat.* Mol. Pharmacol. 1987;33:140-143.

**Belpaire, F.M., De Smet, F., Chindavijak, B., Fraeyman, N., Bogaert, M.G.,** *Effect of turpentine-induced inflammation on the disposition kinetics of propranolol, metoprolol and antipyrine in the rat.* Fundam. Clin. Pharmacol. 1989;3:79-88.

**Benjamini, E., Sunshine, G., Leskowitz, S.,** *Immunology : A short course.* Third edition, Wiley-Liss, New York, 1996.

**Bernhardt, R.,** *Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species.* Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 1996;127:137-221.

**Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Asman, M., Jendeborg, L., Sydow-Backman, M., Ohlsson, R., Postlind, H., Blomquist, P., Berkenstam, A.,** *Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998;95:12208-12213.

**Bleau, A.M., Fradette, C., El-Kadi, A.O.S., Côté, M.C., du Souich, P.,** *Cytochrome P450 down-regulation by serum from humans with a viral infection and from rabbits with an inflammatory reaction.* Drug Metab. Dispos. 2001;29:1007-1012.

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

**Bonizzi, G., Piette, J., Schoonbroodt, S., Greimers, R., Havard, L., Merville, M.P., Bours, V.,** *Reactive oxygen intermediate-dependant NF-kappaB activation by*

*interleukin-1 $\beta$  requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity.* Mol. Cell. Biol. 1999;19:1950-1960.

**Bork, R.W., Muto, T., Beaune, P.H., Srivastava, P.K., Lloyd, R.S., Guengerich, F.P.,** *Characterization of mRNA species related to human liver cytochrome P-450 nifedipine oxidase and the regulation of catalytic activity.* J. Biol. Chem. 1989;264:910-919.

**Braugher, J.M., Pregenzer, J.F.,** *The 21-aminosteroid inhibitors of lipid peroxidation: Reactions with lipid peroxyl and phenoxy radicals.* Free Radic. Biol. Med. 1989;7:125-130.

**Braugher, J.M., Chase, R.L., Neff, G.L.,** *A new 21-aminosteroid antioxidant lacking glucocorticoid activity stimulates adrenocorticotrophin secretion and blocks arachidonic release from mouse pituitary tumor (AtT-20) cells.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 1988;244:423-427.

**Braugher, J.M., Pregenzer, J.F., Chase, R.L., Duncan, L.A., Jacobson, E.J., McCall, J.M.,** *Novel 21-aminosteroids as potent inhibitors of iron-dependant lipid peroxidation.* J. Biol. Chem. 1987;262:10438-10440.

**Bredt, D.S., Snyder, S.H.,** *Nitric oxide: a physiologic messenger molecule.* Annu. Rev. Biochem. 1994;63:175-195.

**Buttgereit, F., Brink, I., Thiele, B., Burmester, G.R., Hiepe, F., Hall, E.D.,** *Effects of methylprednisolone and 21-aminosteroids on mitogen-induced interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in human peripheral blood mononuclear cells.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 1995;275:850-853.

**Cadenas, E., Sies, H., Nastainczyk, W., Ullrich, V.,** *Singlet oxygen formation detected by low-level chemiluminescence during enzymatic reduction of prostaglandin G<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>.* Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 1983;364:519-528.

**Calleja, C., Eeckhoutte C., Larrieu, G., Dupuy, J., Pineau, T., Galtier, P.,** *Differential effects of interleukin-1 beta, interleukin-2, and interferon-gamma on the inducible expression of CYP1A1 and CYP1A2 in cultured rabbit hepatocytes.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997;239:273-278.

**Carlson, T., Billings, R.E.,** *Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450.* Mol. Pharmacol. 1996;49:796-801.

**Castell, J., Gomez-Lechon, M.J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R.,** *Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes.* FEBS Lett. 1989;242:237-239.

**Chang, K.C., Lauer, B.A., Bell, T.D., Chai, H.,** *Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness.* Lancet 1978;1:1132-1133.

**Chen, J., Nikolova-Karakashian, M., Merrill, A.H., Morgan, E.T.,** *Regulation of cytochrome P4502C11 (CYP2C11) gene expression by interleukin-1, sphingomyelin hydrolysis, and ceramides in rat hepatocytes.* J. Biol. Chem. 1995;270:25233-25238.

**Chen, Y., Florentin, I., Batt, A., Ferrari, L., Giroud, J., Chauvelot-Maochon, L.,** *Effects of interleukine-6 on cytochrome P450-dependant mixed-function oxidases in the rat.* Biochem. Pharmacol. 1992; 44: 137-148.

**Craig, P.I., Mehta, I., Murray, M., McDonald, D., Aström, A., van der Meide P.H., Farrell, G.C.,** *Interferon down regulates the male-specific cytochrome P450III<sub>A</sub>2 in rat liver.* Mol. Pharmacol. 1990;38:313-318.

**Cribb, A.E., Delaporte, E., Kim, S.G., Novak, R.F., Renton, K.W.,** *Regulation of cytochrome P-4501A and cytochrome P-4502E induction in the rat during the production of interferon alpha/beta.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 1994;268:487-494.

**Cribb, A.E., Renton, K.W.,** *Dissociation of xanthine oxidase induction and cytochrome P450 depression during interferon induction in the rat.* Biochem. Pharmacol. 1993;46:2114-2117.

**Currin, R.T., Reinstein, L.J., Lichtman, S.N., Thurman, R.G., Lemasters, J.J.,** *Inhibition of tumor necrosis factor release from cultured rat Kupffer cells by agents that reduce graft failure from storage injury.* Transplant Proc. 1993;25:1631-1632.

**Darnell, Jr. J.E.,** *STATs and gene regulation,* Science 1997;277:1630-1635.

**Darnell, Jr. J.E., Kerr, I.M., Stark, G.R.,** *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.* Science 1994;264:1415-1421.

**Degli Esposti, M., McLennan, H.,** *Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobiosis: Relevance to ceramide-induced apoptosis.* FEBS Lett. 1998;430:338-342.

**Delaporte, E., Cribb, A.E., Renton, K.W.,** *Modulation of rat hepatic CYP3A1 induction by the interferon inducer polyinosinic acid-polycytidylic acid (polyic).* Drug Metab. Dispos. 1993;21:520-523.

**Donato, M.T., Guillen, M.I., Jover, R., Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J.,** *Nitric oxide-mediated inhibition of cytochrome P450 by interferon-gamma in human hepatocytes.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997;281:484-490.

**Duranteau, J., Chandel, N.S., Kulisz, A., Shao, Z., Schumacker, P.T.,** *Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes.* J. Biol. Chem. 1998;273:11619-11624.

**du Souich, P., Hoen, B., Saunier, C., Hartemann, D., Sautegau, A., Cornette, A., Delorme, N., Polu, J.M., Sadoul, P.,** *Theophylline disposition in patients with COLD with and without hypoxemia.* Chest 1989;95:1028-1032.

**du Souich, P., Varin, F., Courteau, H.,** *Effect of hypercapnia and/or hypoxemia and metabolic acidosis on kinetics and concentrations of phenytoin in the cerebrospinal fluid of conscious rabbits.* Neuropharmacol. 1986;25:857-862.

**Ebel, R.E., O'Keeffe, D.H., Peterson, J.A.,** *Nitric oxide complexes of cytochrome P450.* FEBS Lett. 1975;55:198-201.

**Eliasson, E., Mkrtchian, S., Halpert, J.R., Ingelman-Sundberg, M.,** *Substrate-regulated, cAMP-dependant phosphorylation, denaturation, and degradation of glucocorticoid-inducible rat liver cytochrome P450A1.* J. Biol. Chem. 1994;269:18378-18383.

**El-Kadi, A.O.S., Bleau, A.M., Dumont, I., Maurice, H., du Souich, P.,** *Role of reactive oxygen intermediates in the decrease of hepatic cytochrome P450 activity by serum of humans and rabbits with an acute inflammatory reaction.* Drug Metab. Dispos. 2000;28:1112-1120.

**El-Kadi, A.O.S., Maurice, H., Ong, H., du Souich, P.,** *Down-regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of mediators in human and animal serum and in the liver.* Br. J. Pharmacol. 1997; 121:1164-1170.

**El-Sankary, W., Plant, N.J., Gibson, G.G., Moore, D.J.,** *Regulation of the CYP3A4 gene by hydrocortisone and xenobiotics: role of the glucocorticoid and pregnane X receptors.* Drug Metab. Dispos. 2000;28:493-496.

**Faure, V., Hecquet, C., Courtois, Y., Goureau, O.,** *Role of interferon regulatory factor-1 and mitogen-activated protein kinase pathways in the induction of nitric oxide synthase-2 in retinal pigmented epithelial cells.* J. Biol. Chem. 1999;274:4794-4800.

**Fernandez Rodriguez, M.P., Belmonte, A., Meizoso, M.J., Garcia-novio, M., Garcia-Iglesias, E.,** *Effect of tirilazad on brain nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia in rats.* Pharmacology 1997;54:108-112.

**Ferrari, L., Herber, R., Batt, A.M., Siest, G.,** *Differential effects of human recombinant interleukin-1 beta and dexamethasone on hepatic drug-metabolizing enzymes in male and female rats.* Biochem. Pharmacol. 1993;45:2269-2277.

**Fici, G.J., Althaus, J.S., Voigtlander, P.F., Von,** *Effects of lazaroids and a peroxy-nitrite scavenger in a cell model of peroxy-nitrite toxicity.* Free Rad. Biol. Med. 1997;22:223-228.

**Fisher, M., Levine, P.H., Cohen, R.A.,** *A 21-aminosteroid U74500A, reduces hydrogen peroxide and chemiluminescence by stimulated human leukocytes.* Stroke 1990;21:1435-1438.

**Fleishaker, J.C., Peters, J.C., Cathcart, K.S.,** *Evaluation of the pharmacokinetics and tolerability of tirilazad mesylate, a 21-aminosteroid free radical scavenger. I. Single-dose administration.* J. Clin. Pharmacol. 1993;33:175-181.

**Flescher, E., Tripoli, H., Salnikow, K., Burns, F.J.,** *Oxidative stress suppresses transcription factor activities in stimulated lymphocytes.* Clin. Exp. Immunol. 1998;112:242-247.

**Flowers, N.L., Miles, P.R.,** *Alterations of pulmonary benzo[a]pyrene metabolism by reactive oxygen metabolites.* Toxicology 1991;68:259-274.

**France-Lanord, V., Brugg, B., Michel, P.P., Agid, Y., Ruberg, M.,** *Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease.* J. Neurochem. 1997;69:1612-1621.

**Freesweek, P.D., Wan, Y., Geller, D.A., Nussler, A.K., Billiar, T.R.,** *Remote tissue injury primes hepatocytes for nitric oxide synthesis.* J. Surg. Res. 1994;57: 205-209.

**Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., Hirano, T.,** *Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis.* Immunity 1996;5:449-460.

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

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

**Fukuma, K., Marubayashi S., Okada, K., Yamada, K., Kimura, A., Dohi, K.,** *Effect of lazaroid U74389G and methylprednisolone on endotoxin-induced shock in mice.* Surgery 1999;125:421-430.

**Gadaleta, D., Verma, M., Davis, J.M.,** *Inhibition of neutrophil leukotriene generation by the 21-aminosteroid, U-74389F.* J. Surg. Res. 1994;57:233-237.

**Galal, A., du Souich, P.,** *21-aminosteroids prevent the down-regulation of hepatic cytochrome P450 induced by hypoxia and inflammation in conscious rabbits.* Br. J. Pharmacol. 1999;128:374-379.

**Galea, E., Feinstein, D.L.,** *Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP.* FASEB J. 1999;13:2125-2137.

**Garfinkel, D.,** *Studies on pig liver microsomes. I. Enzymatic and pigment composition of different microsomal fractions.* Arch. Biochem. Biophys. 1958;77:493-509.

**Geiger, T., Andus, T., Klapproth, J., Hirano, T., Kishimoto, T., Heinrich, P.,** *Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo.* Eur. J. Immunol. 1988;18:717-721.

**Georgakopoulos, E., McMEnamin, M., Skouteris, G.G.,** *Phospholipase A2 is activated by tumor necrosis factor-alpha in primary hepatocytes stimulated by a deleted form of hepatocyte growth factor.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995;217:1263-1270.

**George, J., Liddle, C., Murray, M., Byth, K., Farrell, G.C.,** *Pre-translational regulation of cytochrome P450 genes is responsible for disease-specific changes of individual P450 enzymes among patients with cirrhosis.* Biochem. Pharmacol. 1995;49:873-881.

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

**Gergel, D., Misik, V., Riesz, P., Cederbaum, A.I.,** *Inhibition of rat and human cytochrome P4502E1 catalytic activity and reactive oxygen radical formation by nitric oxide.* Arch. Biochem. Biophys. 1997;337:239-250.

**Ghezzi, P., Saccardo, B., Bianchi, M.,** *Recombinant tumor necrosis factor depresses cytochrome P450-dependent microsomal drug metabolism in mice.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986;136:316-321.

**Ghezzi, P., Bianchi, M., Gianera, L., Landolfo, S., Salmona, M.,** *Role of reactive oxygen intermediates in the interferon-mediated depression of hepatic drug metabolism and protective effect of N-acetylcystein in mice.* Cancer Res. 1985;45:3444-3447.

**Ghezzi, P., Bianchi, M., Mantovani, A., Spreafico, F., Salmona, M.,** *Enhanced xanthine oxidase activity in mice treated with interferon and interferon inducers.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984;119:144-149.

**Gibson, G.G., Skett, P.,** *Introduction to drug metabolism*. 2<sup>nd</sup> ed., Blackie Academic & Professional, New York:1994.

**Glende, E.A., Hruskewycz, A.M., Reckangel, R.O.,** *Critical role of lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced loss of aminopyrine demethylase, cytochrome P-450 and glucose-6-phosphatase*. *Biochem. Pharmacol.* 1976;25:2163-2170.

**Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B.,** *NF- $\kappa$ B and rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. *Annu. Rev. Immunol.* 1998;16:225-260.

**Gonzalez, F.J., Song, B.J., Hardwick, J.P.,** *Pregnenolone 16- $\alpha$ -carbonitrile-inducible P-450 gene. Gene conversion and differential regulation*. *Mol. Cell. Biol.* 1986;6:2969-2976.

**Goodman and Gilman's,** *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th Edition, New York, Pergamon Press, 1996.

**Guengerich, F.P.,** *Catalytic selectivity of human cytochrome P450 enzymes: relevance to drug metabolism and toxicity*, *Toxicol. Lett.*, 1994;70:133-138.

**Guengerich, F.P., Turvy, C.G.,** *Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991;256:1189-1191.

**Gray, J.D., Renton, K.W., Hung, O.R.,** *Depression of theophylline elimination following BCG vaccination*. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1983;16:735-737.

**Greenblatt, D.J., Abernethy, D.R., Morse, D.S., Harmatz, J.S., Shader, R.I.,** *Clinical importance of the interaction of diazepam and cimetidine*. *N. Eng. J. Med.* 1984;310:1639-1643.

**Ha, H.R., Chen, J., Freiburghaus, A.U., Follath, F.,** *Metabolism of theophylline by cDNA-expressed human cytochrome P-450*. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1995;39:321-326.

**Hall, E.D., McCall, J.M., Means, E.D.,** *Therapeutic potential of the lazaroids (21-aminosteroids) in acute central nervous system trauma, ischemia and subarachnoid hemorrhage*. *Adv. Pharmacol.* 1994;28:221-268.

**Hall, E.D.,** *Neuroprotective actions of glucocorticoid and nonglucocorticoid steroids in acute neuronal injury*. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1993;13:415-432.

**Hall, E.D.,** *Beneficial effects of the 21-aminosteroid U-74006F in acute CNS trauma and hypovolemic shock*. *Acta Anaesth. Belg.* 1987;38:421-425.

**Halliwell, B., Gutteridge, J.C., Cross, C.E.,** *Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?* J. Lab. Clin. Med. 1992; 119 : 598-620.

**Halliwell, B., Hoult, J.R., Blake, D.R.,** *Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs.* FASEB J. 1988;2:2867-2873.

**Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.,** *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.* Biochem. 1984;219:1-14.

**Hankinson, O.,** *Aryl hydrocarbon receptor complex.* Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1995;35:307-340.

**Hannun, Y.A.,** *The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide.* J. Biol. Chem. 1994;269:3125-3128.

**Hashimoto, H.K., Toide, R., Kitamura, M., Tagawa, S., Itoh, S., Kamataki, T.,** *Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control.* Eur. J. Biochem. 1993;218:585-595.

**He, Q., Na, X.,** *The effects and mechanisms of a novel 2-aminosteroid on murine WEHI-3B leukemia cells in vitro and in vivo.* Leuk. Res. 2001;25:455-461.

**Heinrich, P., Castell, J., Andus, T.,** *Interleukin-6 and the acute phase response.* Biochem. J. 1990;265:621-636.

**Hendeles, L., Bighley, L., Richardson, R.H., Hepler, D.D., Carmichael, J.,** *Frequent toxicity from IV aminophylline infusions in critically ill patients.* Drug Int. Clin. Pharm. 1977;11:2-18.

**Hinzmann, J.S., Mckenna, R.L., Pierson, T.S., Han, F., Kezdy, F.J., Epps, D.E.,** *Interaction of antioxidants with depth-dependant fluorescence quenchers and energy transfer probes in lipid bilayers.* Chem. Phys. Lipids 1992;62:123-138.

**Hirano, T.,** *Interleukin 6 and its receptor: ten years later.* Int. Rev. Immunol. 1998;16:249-284.

**Hirano, T., Nakajima, K., Hibi, M.,** *Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system.* Cytokine Growth Factor Rev. 1997;8:241-252.

**Homeida, M., Roberts, C.J.C., Halliwell, M., Read, A.E., Branch, R.A.,** *Antipyrine clearance per unit volume liver: an assessment of hepatic function in chronic liver disease.* Gut 1979;20:596-601.

**Horwitz, L.D., Wallner, J.S., Decker, D.E., Buxser, S.E.,** *Efficacy of lipid soluble, membrane-protective agents against hydrogen peroxide cytotoxicity in cardiac myocytes.* Free Rad. Biol. Med. 1996;21:743-753.

**Howden, C.W., Birnie, G.G., Brodie, M.J.,** *Drug metabolism in liver disease.* Pharmacol. Ther. 1989; 40:439-474.

**Huber, T., Grosse-Heitmeyer, W., Rietbrock, S., Harder, S.,** *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of molsidomine in patients with liver dysfunction due to congestive heart failure.* Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 1992;30:491-492.

**Iber, H., Chen, Q., Cheng, P.Y., Morgan, E.T.,** *Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukin-1 mediated by NF- $\kappa$ B binding at the transcription start site.* Arch. Biochem. Biophys. 2000;377:187-194.

**Ihle, J.N.,** *STATs: signal transducers and activators of transcription.* Cell 1996; 84:331-334.

**Ioannides, C., Bass, S.L., Ayrton, A.D., Trinick, J., Walker, R., Flatt, P.R.,** *Streptozotocin-induced diabetes modulates the metabolic activation of chemical carcinogens.* Chem. Biol. Interact. 1988;68: 189-202.

**Ishikawa, M., Sasaki, K., Ozaki, M., Watanabe, K., Takayanagi, Y., Sosaki, K.,** *Hepatic drug metabolizing activity in rats with carrageenin-induced inflammation.* J. Pharmacobio. Dyn. 1991;132-138.

**Jänig, G.R., Kraft, R., Rabe, H., Makower, A., Ruckpaul, K.,** *Comparative studies on the accessibility and functional importance of tyrosine residues in cytochrome P-450 isozymes.* Biom. Biochim. 1988;7:565-579.

**Jänig, G.R., Kraft, R., Blanck, J., Ristau, O., Rabe., Ruckpaul, K.,** *Chemical modification of cytochrome P-450 LM4. Identification of functionally linked tyrosine residues.* Biochim. Biophys. Act. 1987;916:512-523.

**Jenne, J.W.,** *Effect of disease states on theophylline elimination.* J. Allergy Clin. Immunol. 1986;78:727-735.

**Jones, D.P.,** *Hypoxia and drug metabolism.* Biochem. Pharmacol. 1981;30:1019-1023.

**Jover, R., Bort, R., Gomez-Lechon, M.J., Castell, J.V.,** *Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: a study using adenovirus-mediated antisense targeting.* Hepatology 2001;33:668-675.

**Karuzina, I.L., Archakov, A.I.,** *Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P450 during monooxygenase reactions.* Free Radical. Biol. Med. 1994;17:557-567.

**Kaszkin, M., Huwiler, A., Scholz K., van den Bosch, H., Pfeilschifter, J.,** *Negative regulation of interleukin-1 beta-activated neutral sphingomyelinase by protein kinase C in rat mesangial cells.* FEBS Lett. 1998;440:163-166.

**Katzung, B.G.,** *Basic & clinical pharmacology*, 8<sup>th</sup> edition, Lange medical book, 2001.

**Khatsenko, O.G., Barteneva, N.S., de la Maza, L.M., Kikkawa, Y.,** *Role of nitric oxide in the inhibition of cytochrome P450 of mice infected with Chlamydia trachomatis.* Biochem. Pharmacol. 1998;55:1835-1842.

**Khatsenko, O.G.,** *Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997;280:1463-1470.

**Khatsenko, O.G., Gross, S.S., Rifkind, A.B., Vane, J.R.,** *Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependant metabolism caused by immunostimulants.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993;90:11147-11151.

**Kim, H., Baumann, H.,** *Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells.* Mol. Cell Biol. 1999;19:5326-5338.

**Kim, Y.M., Bergonia, H.A., Muller, C., Pitt, B.R., Watkins, W.D., Lancaster, J.R., Jr.,** *Loss and degradation of enzyme-bound heme induced by cellular nitric oxide synthesis.* J. Biol. Chem. 1995;270:5710-5713.

**Kim, K., Rhee, S.G., Stadman, E.R.,** *Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron.* J. Biol. Chem. 1985;260:15394-15397.

**Kitt, T.M., Lunderer, J.R., Shappell, S.B., Mitchell, J.R., Taylor, A.A., Smith, C.W.,** *The effect of U74006F, a novel 21-aminosteroid on human neutrophil function.* FASEB J. 1989;3:A595. (abstract).

**Kliwer, S.A., Moore, J.T., Wade, L., Staudinger, J.L., Watson, M.A., Jones, S.A., McKee, D.D., Oliver, B.B., Willson, T.M., Zetterstrom, R.H., Perlmann, T., Lehmann, J.M.,** *An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway.* Cell 1998;92:73-82.

**Knickle, L.C., Spencer, D.F., Renton, K.W.,** *The suppression of hepatic cytochrome P4504A mRNA mediated by the interferon inducer polyinosinic acid.polyridylic acid.* Biochem. Pharmacol. 1992;44: 604-608.

**Kobusch, A.B., Erill, S., du Souich, P.,** *Relationship between changes in seromucoid concentrations and the rate of oxidation or acetylation of several substrates.* Drug Metab. Dispos. 1986;14:663-667.

**Kocic, G., Vlahovic, P., Dordevic, V., Bjelakovic, G., Koracevic, D., Savic, V.,** *Effects of growth factors on the enzymes of purine metabolism in culture of regenerating rat liver cells.* Arch. Physiol. Biochem. 1995;103:715-719.

**Koj, A.,** *Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines.* Biochim. Biophys. Acta 1996;1317:84-94.

**Kornbrust, D.J., Mavis, R.D.,** *Microsomal lipid peroxidation. II. Stimulation by carbon tetrachloride.* Mol. Pharmacol. 1980;17:408-414.

**Korsmeyer, K.K., Davoll, S., Figueiredo-Pereira, M.E., Correia, M.A.,** *Proteolytic degradation of heme-modified hepatic cytochromes P450 : A role for phosphorylation, ubiquitination, and the 26S proteasome?* Arch. Biochem. Biophys. 1999;365:31-44.

**Kovalovich, K., DeAngelis, R.A., Li, W., Furth, E.E., Ciliberto, G., Taub, R.,** *Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice.* Hepatology 2000;31:149-159.

**Kuo, P.C., Abe, K.Y., Dafoe, D.C.,** *Cytochrome P450III<sub>A</sub> activity and cytokine-mediated synthesis of nitric oxide.* Surgery 1995;118:310-317.

**Kurdi, J., Maurice, H., El-Kadi, A.O.S., Ong, H., Dalkara, S., Bélanger, P.M., du Souich, P.,** *Effect of hypoxia alone or combined with inflammation and 3-methylcholanthrene on hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits.* Br. J. Pharmacol. 1999;128:365-373.

**Kyriakis, J.M.,** *Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family.* Gene Expr. 1999;7:217-231.

**Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., Woodgett, J.R.,** *The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases.* Nature 1994;369:156-160.

**Laflamme, N., Rivest, S.,** *Effects of systemic immunogenic insults and circulating proinflammatory cytokines on the transcription of the inhibitory factor kappaB alpha within specific cellular populations of the rat brain.* J. Neurochem. 1999;73:309-321.

**Lee, S.H., Wang, X., DeJong, J.,** *Functional interactions between an atypical NF-kappaB site from the rat CYP2B1 promotor and the transcriptional repressor RBP-Jkappa/CBF1.* Nucleic Acids Res. 2000;28:2091-2098.

**Lee, N.D., Chen, J., Shpall, Naumovski, L.,** *Subcellular localization of interferon-inducible Myc/stat-interacting protein Nmi is regulated by a novel IFP 35 homologous domain.* J. Interferon Cytokine Res. 1999;19:1245-1252.

**Lee, J.S., Kahlan, S.S., Culbreth, R., Cooper, A.D., Jr.,** *Modulation of monocyte chemokine production and nuclear factor kappa B activity by oxidants.* J. Interferon Cytokine Res. 1999;19:761-767.

**Lehman, J.M., Mckee, D.D. Watson, M.A., Willson, T.M., Moore, J.T., Lehmann, J.M.,** *The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions.* J. Clin. Invest. 1998;102:1016-1023.

**Letarte, L., du Souich, P.,** *Influence of hypercapnia and/or hypoxemia and metabolic acidosis on theophylline kinetics in the conscious rabbit.* Am. Rev. Resp. Dis. 1984;129:762-766.

**Leu, J.I., Crissey, M.A., Leu, J.P., Ciliberto., G., Taub, R.,** *Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury.* Mol. Cell Biol. 2001;21:414-424.

**Li, P.F., Dietz, R., von Harsdorf, R.,** *Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells.* Circulation 1997;96:3602-3609.

**Lorenzle, S., Koedel, U., Frei, K., Bernatowics, A., Fontana, A., Pfister, H.W.,** *Protective effect of a 21-aminosteroid during experimental pneumococcal meningitis.* J. Infect. Dis. 1995;172:113-118.

**Lowry, S.F.,** *Cytokine mediators of immunity and inflammation.* Arch. Surg. 1993;128:1235-1241.

**Lutticken, C., Wegenka, U.M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Yasukawa, K., Taga, T., et coll.,** *Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130.* Science 1994;263:89-92.

**Marleau, S., Ong, H., Gariépy, L., du Souich, P.,** *Lidocain and indocyanine green kinetics : effect of hypoxemia and/or hypercapnia.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 1987;242:338-343.

**Matzke, G.R., Frye, F.R., Early, J.J., Straka, R.J., Carson, S.W.,** *Evaluation of the influence of diabetes mellitus on antipyrine metabolism and CYP1A2 and CYP2D6 activity.* Pharmacotherapy 2000;20:182-190.

**McPhail, L.C., Qualliotine-Mann, D., Agwu, D.E., McCall, C.E.,** *Phospholipases and activation of the NADPH oxidase.* Eur. J. Haematol. 1993; 51:294-300.

**Meyer, R.J., Juarez, R.A., Holden, W.E.,** *21-aminosteroids protect endothelial cells against injury by neutrophils.* Am. Rev. Respir. Dis. 1992;145:A571.

**Meyer, B., Luo, H., Bargetzi, M., Renner, E.L., Stalder, G.A.,** *Quantitation of intrinsic drug-metabolizing capacity in human liver biopsy specimens : support for the intact-hepatocyte theory.* Hepatology 1991;13:475-481.

**Middleton, G., Hamanoue, M., Enokido, Y., Wyatt, S., Pennica, D., Jaffray, E., Hay, R.T., Davies, A.M.,** *Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons.* J. Cell Biol. 2000;148:325-332.

**Morgan, E.T.,** *Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection.* Drug Metab. Rev. 1997;29:1129-1188.

**Morgan, E.T., Thomas, K.B., Swanson, R., Vales, T., Hwang, J., Wright, K.,** *Selective suppression of cytochrome P-450 gene expression by interleukins 1 and 6 in rat liver.* Biochim. Biophys. Acta 1994;1219:475-483.

**Morgan, E.T.,** *Suppression of P450IIC12 gene expression and elevation of actin messenger ribonucleic acid levels in the livers of female rats after injection of the interferon inducer poly rI.poly rC.* Biochem. Pharmacol. 1991;42:51-57.

**Morgan, E.T., Norman, C.A.,** *Pretranslational suppression of cytochrome P-450h (IIC11) gene expression in rat liver after administration of interferon inducers.* Drug Metab. Dispos. 1990;18:649-653.

**Morris, S.M. Jr., Billiar, T.R.,** *New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis.* Am. J. Physiol. 1994;266:829-39

**Moshage, H.,** *Cytokines and the hepatic acute phase response.* J. Pathol. 1997;181:257-266.

**Muntané-Relat, J., Ourlin, J.C., Domergue, J., Maurel, P.,** *Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture.* Hepatology 1995;22:1143-1153.

**Murray, M.,** *P450 enzymes: Inhibition mechanisms, genetic regulation and effects of liver disease.* Clin. Pharmacokinet. 1992;23:132-146.

**Nadin, L., Butler, A.M., Farrell, G.C., Murray, M.,** *Pretranslational down-regulation of cytochromes P450 2C11 and 3A2 in male rat liver by tumor necrosis factor alpha.* Gastroenterology 1995;109:198-205.

**Nathan, C.,** *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.* FASEB J. 1992; 6:3051-3064.

**Nebert, D.W., Nelson, D.R., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrooke, R.W., Gonzalez F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper B., Levin, W., Philipps, I.R., Sato, R., Waterman, M.R.,** *The P450 superfamily :*

*updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci.* DNA 1989;8:1-13.

**Ng, C.Y., Angus, P.W., Ghabrial, H., Chou, S.T., Arnold L., Morgan, D.J., Smallwood, R.A.,** *Right heart failure impairs hepatic oxygenation and theophylline clearance in rats.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 1995;273:1332-1336.

**Okada, K., Marubayashi, S., Fukuma, K., Yamada, K., Dohi, K.,** *Effect of the 21-aminosteroid on nuclear factor- $\kappa$ B activation of Kupffer cells in endotoxin shock.* Surgery 2000;127:79-86.

**Omura, T., Sato, R.,** *The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature.* J. Biol. Chem. 1964;239:2370-2378.

**Paintaud, G., Bechtel, Y., Brientini, M.P., Miguët, J.P., Bechtel, P.R.,** *Effects of liver diseases on drug metabolism.* Thérapie 1996;51:384-389.

**Parent, C., Bélanger, P.M., Jutras, L., du Souich, J.,** *Effect of inflammation on the rabbit hepatic cytochrome P-450 isoenzymes: alterations in the kinetics and dynamics of tolbutamide.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 1992;261:780-787.

**Parikh, A.A., Moon, M.R., Pritts, T.A., Fischer, J.E., Szabo, C., Hasselgren, P.O., Salzman, A.L.,** *IL-1 $\beta$  induction of NF- $\kappa$ B activation in human intestinal epithelial cells is independent of oxyradical signaling.* Shock 2000;13:8-13.

**Park, C.S., Baek, H.M., Chung, W.G., Lee, K.H., Ryu, S.D., Cha, Y.N.,** *Suppression of flavin-containing monooxygenase by overproduced nitric oxide in rat liver.* Mol. Pharmacol. 1999;56:507-514.

**Pascussi, J.M., Gerbel-Chaloin, S., Pichard-Garcia, L., Daujat, M., Fabre, J.M., Maurel, P., Vilarem, M.J.,** *Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000;274:707-713.

**Pasco, D.S., Fagan, J.B., Barker, C.W.,** *Down-regulation of P4501A2 and P4501A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress.* 10<sup>th</sup> International Symposium on microsomes & Drug oxidations. University of Toronto, p. 345.

**Patel, I.H., Soni, P.P., Fukuda, E.K., Smith, D.F., Leier, C.V., Boudoulas, H.,** *The pharmacokinetics of midazolam in patients with congestive heart failure.* Br. J. Clin. Pharmacol. 1990;29:565-569.

**Pfeffer, K.D., Huecksteadt, T.P., Hoidal, J.R.,** *Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells. Cytokine and steroid regulation.* J. Immunol. 1994;153:1789-1797.

**Proulx, M., du Souich, P.,** *Inflammation-induced decrease in hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits is accompanied by an increase in hepatic oxidative stress.* Res. Commun. Mol. Path. Pharmacol. 1995b;87:221-236.

**Proulx, M., Maupoil, V., Rochette L., du Souich, P.,** *Increase in antilipoperoxidant activity of plasma as a consequence of an inflammatory reaction induced by subcutaneous turpentine in the rabbit.* Free Rad. Res. 1995a;23:245-254.

**Pryor, W.A.,** *Oxyradicals and related species : their formation, lifetimes, and reactions.* Annu. Rev. Physiol. 1986;48:657-667.

**Puntarulo, S., Cederbaum, A.I.,** *Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes.* Free Radic. Biol. Med. 1998;24:1324-1330.

**Pyerin, W., Taniguchi, H., Horn, F., Oesch, F., Amelizad, Z., Friedberg, T., Wolf, C.R.,** *Isoenzyme-specific phosphorylation of cytochromes P-450 and other drug metabolizing enzymes.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987;142:885-892.

**Quattrochi, L.C., Shih, H., Pickwell, G.V.,** *Induction of the human CYP1A2 enhancer by phorbol ester.* Arch. Biochem. Biophys. 1998;350:41-48.

**Quillet-Mary, A., Jaffrezou, J.P., Mansat, V., Bordier, C., Naval, J., Laurent, G.,** *Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis.* J. Biol. Chem. 1997;272:21388-21395.

**Ramshaw, I.A., Ramsay, A.J., Karupiah, G., Rolph, M.S., Mahalingan, S., Ruby, J.C.,** *Cytokines and immunity to viral infections.* Immunol. Rev. 1997;159:119-135.

**Regnault, J.P.,** *Immunologie générale.* Décarie éditeur, Montréal, 1998.

**Rendic, S., Di Carlo, F.J.,** *Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors.* Drug Metab. Rev. 1997;29:413-580.

**Renton, K.W., Gray, J.D., Hall, R.I.,** *Decreased elimination of theophylline after influenza vaccination.* C.M.A. J. 1980;123:288-290.

**Reznikov, L.L., Shames, B.D., Barton, H.A., Selzman, C.H., Fantuzzi, G., Kim, S.H., Johnson, S.M., Dinarello, C.A.,** *Interleukin-1beta deficiency results in reduced NF-kappaB levels in pregnant mice.* Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2000;278:263-270.

**Rhee, S.G.,** *Redox signaling : Hydrogen peroxide as intracellular messenger.* Exp. Mol. Med. 1999;31:53-59.

**Robson, R.A., Matthews, A.P., Miners, J.O., Mcmanus, M.E., Meyer, U.A., Hall, P.M., Birkett, D.J.,** *Characterization of theophylline metabolism in human liver microsomes.* Br. J. Clin. Pharmacol. 1987;24:293-330.

**Rosenfeld, M.E.,** *Inflammation, lipids, and free radicals: lessons learned from the atherogenic process.* Semin. Reprod. Endocrinol. 1998;16:249-261.

**Rusyn, I., Tsukamoto, H., Thurman, R.G.,** *WY-14643 rapidly activates nuclear factor kappaB in kupffer cells before hepatocytes.* Carcinogenesis 1998;19:1217-1222.

**Saadane, A., Neveux, N., Feldmann, G., Lardeux, B., Bleiberg-Daniel, F.,** *Inhibition of liver RNA breakdown during acute inflammation in the rat.* Biochem. J. 1996;317:907-912

**Sakai, H., Okamoto, T., Kikkawa, Y.,** *Suppression of hepatic drug metabolism by the interferon inducer, polyribonucleosinic acid:polyribocytidylic acid.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 1992;263:381-386.

**Saklatvala, J., Dean, J., Finch, A.,** *Protein kinase cascades in intracellular signalling by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha.* Biochem. Soc. Symp. 1999;64:63-77.

**Salahudeen, A., Wang, C., McDaniel, O., Lagoo-Denadyalan, S., Bigler, S., Barber, H.,** *Antioxidant lazaroid U-74006F improves renal function and reduces the expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and MHC antigens in a syngeneic renal transplant model.* Transplantation 1996;62:1628-1633.

**Sales, M.E., Sterin-Borda, L., de Bracco, M.M., Borda, E.S.,** *Tyrosine kinase regulatory action on ileal muscarinic effects of IFN-gamma.* J. Interferon Cytokine Res. 1999;19:375-382.

**Sarkar, M.A., Jackson, B.J.,** *Theophylline demethylation as probes for P4501A1 and P4501A2.* Drug Metab. Dispos. 1994;22:827-834.

**Schindler, C., Darnell, J.E.,** *Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway.* Annu. Rev. Biochem. 1995;64:621-651.

**Schoene, B., Fleischmann R.A., Reemer, H., von Oldershausen H.F.,** *Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver.* Eur. J. Clin. Pharmacol. 1972;4:65-73.

**Secor, J.W., Schenker, S.,** *Drug metabolism in patients with liver disease.* Adv. Intern. Med. 1987;32:379-406.

**Sedman, A.J.,** *Cimetidine-drug interactions.* Am. J. Med. Aust. 1984;76:109-114.

**Seale, J.P., Compton, M.R.,** *Side-effects of corticosteroid agents.* Med. J. 1986; 144:139-142.

**Semrad, S.D., Rose, M.L., Adams, J.L.,** *Effect of tirilazad mesylate (U74006F) on eicosanoid and tumor necrosis factor generation in healthy and endotoxemic neonatal calves.* Circ. Shock 1993;40:235-242.

**Serino, F., Grevel, J., Napoli, K.L., Kahan, B.D., Strobel, H.W.,** *Generation of oxygen radicals during the metabolism of cyclosporin A: A cause-effect relationship with metabolism inhibition.* Mol. Cell. Biochem. 1993;122:101-112.

**Shedlofsky, S.I., Israel, B.C., Tosheva, R., Blouin, R.A.,** *Endotoxin depresses hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism in women.* Br. J. Clin. Pharmacol. 1997;43:627-32.

**Shenkar, R., Abraham, E.,** *Effects of treatment with the 21-aminosteroid, U74389F, on pulmonary cytokine expression following hemorrhage and resuscitation.* Crit. Care Med. 1995;23:132-139.

**Siewart, E., Bort, R., Kluge, R., Heinrich, P.C., Castell, J., Jover, R.,** *Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependant.* Hepatology 2000;32:49-55.

**Sonne, J., Dössing, M., Loft, S., Andreasen, P.B.,** *Antipyrine clearance in pneumonia.* Clin. Pharmacol. Ther. 1985;37:701-704.

**Southorn, P.A.,** *Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease.* Mayo Clin. Proc. 1988;63:390-408.

**Spapen, H., Zhang, H., Vincent, J.L.,** *Potential therapeutic value of lazarets in endoxemia and other forms of sepsis.* Shock 1997;8:321-327.

**Stadler, J., Trockfeld, J., Schmalix, W.A., Brill, T., Siewert, J.R., Greim, H., Doehmer, J.,** *Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1994; 91:3559-3563.

**Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S.,** *Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components.* Science 1994;263:92-95.

**Stanley, L.A., Adams, D.J., Balkwill, F.R., Griffin, D., Wolf, C.R.,** *Differential effects of recombinant interferon alpha on constitutive and inducible cytochrome P450 isozymes in mouse liver.* Biochem. Pharmacol. 1991;42:311-320.

**Tapner, M., Liddle, C., Goodwin, B., George, J., Farrell, G.C.,** *Interferon gamma down-regulates cytochrome P450 3A genes in primary cultures of well-differentiated rat hepatocytes.* Hepatology 1996;24:367-373.

**Teunissen, M.W.E., Spoelstra, P., Koch, C.W., Weeda, B., van Duyn, W., Janseens, A.R., Breimer, D.D.,** *Antipyrine clearance and metabolite formation in patients with alcoholic cirrhosis.* Br. J. Clin. Pharmacol. 1984;18:707-715.

**Testa, B.,** *The metabolism of drugs and other xenobiotics.* in Biochemistry of redox reactions, Academic Press, New York, 1995:78-87.

**Thomas, P.D., MAO, G.D., Rabinovich, A., Poznansky, M.J.,** *Inhibition of superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils by lazaroids (21-aminosteroids and 2-methylaminochromans).* Biochem. Pharmacol 1993;45:241-254.

**Tinel, M., Ekkahwaji, J., Robin, M.A., Fardel, N., Descatoire, V., Haouzi, D., Berson, A., Pessayre, D.,** *Interleukin-2 overexpresses c-myc and down-regulates cytochrome P-450 in rat hepatocytes.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999;289:649-655.

**Tröger, U., Meyer, F.P.,** *Influence of endogenous and exogenous effectors on the pharmacokinetics of theophylline. Focus on biotransformation.* Clin. Pharmacokinet. 1995;28:287-314.

**Villa, R.F., Gorini, A.,** *Pharmacology of lazaroids and brain energy metabolism: a review.* Pharmacol. Rev. 1997;49:99-136.

**Wang, S., Leonard, S.S., Castranova, V., Vallyathan, V., Shi, X.,** *The role of superoxide radical in TNF-alpha induced NF-kappaB activation.* Ann. Clin. Lab. Sci. 1999;29:192-199.

**Wang, Y., Ripperger, J., Fey, G.H., Samols, D., Kodula, T., Wetzler, M., Van Etten, R.A., Baumann, H.,** *Modulation of hepatic acute phase gene expression by epidermal growth factor and Src protein tyrosine kinases in murine and human hepatic cells.* Hepatology 1999;30:682-697.

**Wasil, M., Halliwell, B., Moorhouse, C.P., Hutchison, D.C.S., Baum, H.,** *Biologically-significant scavenging of myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by some anti-inflammatory drugs.* Biochem. Pharmacol. 1987:3847-3850.

**Wiegmann, K., Schutze, S., Machleidt, T., Witte, D., Kronke, M.,** *Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling.* Cell 1994;78:1005-1015.

**Wink, D.A., Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Jones, C.R., Eshenaur, S.C., Nims, R.W.,** *Inhibition of cytochrome P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent.* Arch. Biochem. Biophys. 1993;300:115-123.

**Wright, K., Morgan, E.T.,** *Regulation of cytochrome P450IIC12 expression by interleukin-1 alpha, interleukin-6, and dexamethasone.* Mol. Pharmacol. 1991; 39:468-

**Wrighton, S.A., Schuetz, E.G., Watkins, P.B., Maurel, P., Bailey, H.T., Hartle, B., Young, B., Guzelian, P.,** *Demonstration in multiple species of inducible hepatic cytochromes P-450 and their mRNAs related to the glucocorticoid-inducible cytochrome P-450 of the rat.* Mol. Pharmacol. 1985;28:312-321.

**Wu, H., Moulton, K., Spencer, D.F., Renton, K.W.,** *Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene.* Biochem. Pharmacol. 1992;14:2129-2139.

**Yamanaka, Y., Nakajima, K., Fukada, T., Hibi, M., Hirano, T.,** *Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation.* EMBO J. 1996;15:1557-1565.

**Yamazoa, Y., Muryama, N., Shimada, M., Yamauchi, K., Kato, R.,** *Cytochrome P450 in livers of diabetic rats: regulation by growth hormone and insulin.* Arch. Biochem. Biophys. 1989;268:567-575.

**Zamanian-Daryoush, M., Mogensen, T.H., DiDonato, J.A., Williams, B.R.,** *NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase.* Mol. Cell. Biol. 2000;20:1278-1290.

**Zarco, P., Maestre, C., Herrero-Beaumont, G., Gonzalez, E., Garcia-Hoyo, R., Navarro, F.J., Braquet, P., Egido, J.,** *Involvement of platelet-activating factor and tumor necrosis factor in the pathogenesis of joint inflammation in rabbits.* Clin. Exp. Immunol. 1992;88:318-323.

**Zhang, H., Spapen, H., Manikis, P., Rogiers, P., Metz, G., Buurman, W.A., Vincent, J.L.,** *Tirilazad mesylate (U74006F) inhibits effects of endotoxin in dogs.* Am. J. Physiol. 1995;268:H1847-H1855.

**Zhang, Z.Y., Kaminsky, L.S.,** *Characterization of human cytochrome P450 involved in theophylline 8-hydroxylation.* Biochem. Pharmacol. 1995;50:205-211

## REMERCIEMENTS

J'aimerais exprimer toute ma gratitude envers le Docteur Patrick du Souich qui a assumé la direction de mes études ainsi que pour son soutien constant à ma formation. Sa disponibilité et ses conseils judicieux ont été des éléments précieux à la réalisation de ce travail de recherche.

Je souhaite également exprimer mes remerciements à mesdames Hélène Courteau et Lucie Héroux pour leur assistance technique ainsi qu'à tous mes collègues de travail.