

Université de Montréal

**Inactivation et régulation négative du
cytochrome P450 par une réaction inflammatoire:
médiateurs et mécanismes d'action**

Par

Anne-Marie Bleau

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D)

En Pharmacologie

Avril 2002

© Anne-Marie, 2002



W

4

1858

2002

v. 106

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Inactivation et régulation négative du
Cytochrome P450 par une réaction inflammatoire:
médiateurs et mécanismes d'action

présentée par :
Anne-Marie Bleau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Marielle Gascon-Barré, président-rapporteur
Patrick du Souich, directeur de recherche
Gabriel Plaa, membre du jury
Pierre-Maxime Bélanger, examinateur externe
Nicole Lemieux, représentant du doyen de la FES

Résumé

Chez l'humain, la réponse inflammatoire diminue la clairance des médicaments et peut entraîner des manifestations de toxicité. Ce problème résulte d'une diminution de la quantité et de l'activité des enzymes de la famille du cytochrome P450 (P450) hépatique. Parmi les modèles expérimentaux d'inflammation, l'induction d'une réaction inflammatoire aiguë (RIA) par l'injection sous-cutanée de térébenthine chez le lapin reproduit ces effets: il se produit une diminution des niveaux d'ARNm codant pour les CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 et de la quantité des protéines correspondantes, ce qui se traduit par une réduction de la biotransformation de substrats. *In vitro*, l'incubation du sérum de lapins avec une RIA et d'humains souffrant d'une infection virale des voies respiratoires supérieures (IVVRS) avec des hépatocytes de lapins avec RIA diminuent en 4 hr l'activité du P450. Cette baisse se manifeste par une réduction du contenu total en P450 et du métabolisme de la théophylline, sans diminution de la quantité de protéines. Des médiateurs de l'inflammation contenus dans ces sérums pourraient donc diminuer l'activité de différentes isoenzymes du P450.

Notre premier objectif consistait à identifier les médiateurs sériques responsables de la baisse d'activité du P450 observée dans les hépatocytes de lapins avec une RIA. L'hypothèse de notre travail voulait qu'il s'agisse de cytokines sécrétées par les cellules du système immunitaire, les cytokines candidates étaient l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF α et l'IFN γ . À cette fin, les protéines sériques ont d'abord été séparées selon leurs masses moléculaires (Mr) par chromatographie. La capacité des fractions à diminuer le P450 a été testée en les

ajoutant à des cultures d'hépatocytes puis en mesurant la teneur en P450 par spectrophotométrie. Les médiateurs ont ensuite été identifiés par immuno-neutralisation de l'activité des cytokines à l'aide d'anticorps spécifiques.

Dans le sérum de lapin avec une RIA, seule la fraction contenant des protéines de Mr entre 15 à 23 kDa a entraîné une diminution du P450 total: cet intervalle de Mr correspond aux valeurs attendues pour les cytokines candidates. Les expériences d'immuno-neutralisation ont montré que seule l'IL-6 est impliquée dans la baisse d'activité. Dans le sérum d'humains avec IVVRS, la fraction la plus active correspond à une Mr >95 kDa, suivie de la fraction de Mr 15 à 23 kDa; l'immuno-neutralisation a montré que les cytokines sont les molécules actives dans la baisse du P450, et qu'elles existent sous forme libre ou liée. L'IFN γ présente la plus grande efficacité, suivi de l'IL-6 et de l'IL-1 β . Ces résultats démontrent que les médiateurs sériques responsables de la diminution de l'activité du P450 sont des cytokines.

Le second objectif visait à définir les paramètres qui déterminent l'intensité de l'effet des sérums sur la régulation négative du P450, soit le temps d'incubation, l'état des hépatocytes (i.e. normaux ou influencés par une RIA) et le type d'inflammation. Les sérums de lapins et d'humains avec inflammation ont été incubés avec des hépatocytes de lapins normaux et avec une RIA pendant 4 et 24 hr. L'activité de l'ensemble des isoformes a été évaluée en mesurant le contenu total en P450, l'activité des CYP1A1 et 1A2 par le taux de formation des métabolites de la théophylline mesuré par HPLC, et la quantité de protéine des CYP1A1, 1A2 et 3A6 par buvardage de type Western et immuno-détection.

L'incubation du sérum de lapins avec RIA avec des hépatocytes de lapins normaux n'a produit aucun changement en 4 hr. Cependant, après 24 hr, le sérum a entraîné une réduction du contenu total en P450, du métabolisme de la théophylline et de la quantité de CYP3A6, sans changement des CYP1A1 et 1A2. En présence d'hépatocytes de lapins avec RIA, le sérum a produit une plus grande baisse du contenu total et de l'activité du P450, sans toutefois affecter la quantité des CYP1A1 et 1A2. Comme la teneur en CYP3A6 est en deçà du niveau détectable dans ces hépatocytes, il a été impossible de déterminer l'effet du sérum sur cette isoforme.

Le sérum d'humains avec une IVVRS a diminué en 4 hr le contenu total et l'activité du P450 dans les hépatocytes de lapins normaux, sans modifier la quantité des CYP1A1, 1A2 et 3A6; après 24 hr, le contenu total et l'activité du P450 étaient davantage réduits, et seulement la quantité de CYP3A6 était diminuée. Dans des hépatocytes de lapins avec RIA, le sérum a réduit en 4 hr l'activité et le contenu total en P450, sans changer la quantité des isoformes du P450; après 24 hr, la baisse d'activité était plus prononcée, avec une réduction de la quantité des CYP1A1 et A2. Ces résultats montrent qu'en regard du P450 hépatique, 1) le premier phénomène à survenir lors de l'inflammation est la diminution de l'activité du P450, diminution qui se poursuit au cours du processus inflammatoire, 2) en 24 hr, il se produit également une régulation négative, 3) le sérum d'humains avec une IVVRS présente une plus grande efficacité à réduire l'activité et l'expression du P450 que le sérum de lapin avec une RIA, et 4) les hépatocytes provenant de lapins avec une RIA sont plus sensibles au sérum que ceux de lapins normaux.

Le dernier objectif consistait à identifier les médiateurs sériques responsables de la régulation négative du P450. Les sérums de lapins et d'humains avec une réaction inflammatoire diminuent les niveaux d'ARNm des CYP1A1, 1A2 et 3A6: cette baisse est plus prononcée à 48 hr qu'à 24 hr et s'accompagne d'une réduction de la quantité des protéines correspondantes. Dans le sérum de lapins, les fractions contenant des protéines de 15 à 31 kDa diminuent l'ARNm et la quantité des CYP1A1, 1A2 et 3A6. La neutralisation de l'activité de cytokines a démontré que l'IL-6 est impliquée dans la baisse du CYP1A1, alors que l'IL-1 β et l'IL-6 sont responsables de la baisse des CYP1A2 et CYP3A6. Pour le sérum d'humains avec une IVVRS, les fractions contenant des protéines de 15 à 31 kDa réduisent également l'ARNm et la quantité des CYP1A1 et 1A2. Toutefois, les fractions n'entraînent pas de changements significatifs dans le niveau d'ARNm du CYP3A6, mais diminuent la quantité de la protéine. Les médiateurs sériques responsables de cette baisse sont l'IFN- γ et le TNF- α pour les CYP1A1 et 1A2, et les 4 cytokines testées pour le CYP3A6. Ces résultats démontrent que le sérum provenant de sujets avec inflammation contient des médiateurs capables de réprimer certaines isoformes du P450 et que ces médiateurs sont des cytokines. La réduction de l'expression des isoformes du P450 se fait principalement au niveau transcriptionnel, ce qui rend compte de la baisse en protéines. Le CYP3A6 montre cependant un mécanisme de régulation différent après exposition au sérum humain, soit des réductions de la transcription et de la traduction.

Mots-clés : Cytochrome P450, inflammation, métabolisme, cytokine, expression, lapin, humain, hépatocytes.

Abstract

In humans, inflammation and infection reduce the clearance of drugs which in turn can lead to undesirable plasma concentrations, with consequences on therapeutic effect and toxicity. This problem results from decreases in amount and activity of hepatic cytochrome P450. The induction of an acute inflammatory reaction by the injection of turpentine in rabbits reproduces these effects: there is a decrease in mRNA levels and amounts of CYP1A1, CYP1A2 and 3A6 apoproteins, which in turn reduce the rate of drug biotransformation. *In vitro*, the incubation of serum from rabbits with a turpentine-induced acute inflammation reaction (TIAR) and from humans with an upper respiratory viral infection (URVI) reduce in 4 h the catalytic activity of P450. This reduction is evidenced by decreases in total P450 content and metabolism of theophylline, without affecting the amount of P450 isoforms. These data indicate that serum from subjects with an inflammatory reaction contains mediators capable of decreasing the activity of different P450 isoforms.

The first objective of this study was to identify the serum mediators responsible for the decrease in P450 activity observed in hepatocytes from rabbits with a TIAR. Our hypothesis was that cytokines released by cells from the immune system are involved; candidate cytokines were IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α . To this purpose, serum proteins were first fractionated by size exclusion high-performance liquid chromatography and the fractions tested for their ability to reduce total P450 content after 4 h of incubation with

hepatocytes from rabbits with a TIAR. Mediators were identified by direct neutralization of the activity of cytokines with specific antibodies.

In serum from rabbits with a TIAR, only the fraction containing proteins of relative mass (Mr) of 15-23 kDa decreased total P450 content: this range of Mr corresponds to the expected values for the candidate cytokines. Immuno-neutralization experiments showed that only IL-6 is involved in the reduction of P450 activity. In serum from humans with an URVI, the most active fraction was of Mr >95 kDa, followed by the Mr 15-23 kDa fraction. Neutralization experiments revealed that cytokines are the active molecules in both fractions, and that they exist in free or bound forms. IFN- γ showed the highest efficacy, followed by IL-6 and IL-1 β . These results demonstrate that the serum mediators responsible for the decrease in P450 activity are cytokines.

The second objective was to define the parameters that determine the intensity of the effect of serums on P450 down-regulation, these include incubation time, status of the hepatocytes (i.e. from controls or rabbits with a TIAR) and type of inflammation. Serum from rabbits with a TIAR and from humans with a URVI were incubated for 4 and 24 h with hepatocytes from control rabbits as well as rabbits with a TIAR. Total P450 activity was measured spectrophotometrically, the activity of CYP1A1 and 1A2 by the metabolism of theophylline as assessed by HPLC, and the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins by Western blotting and immuno-detection.

Incubation of serum from rabbits with a TIAR with control hepatocytes for 4 h did not change any of the parameters of hepatic P450. However, after 24 h, this serum reduced

total P450 content, extent of metabolism of theophylline, and amount of CYP3A6, without changing amounts of CYP1A1 and 1A2. Upon incubation of hepatocytes from rabbits with a TIAR, the serum produced greater decreases in total P450 content and activity, without affecting levels of CYP1A1 or 1A2. Since the amount of CYP3A6 apoprotein was below the detection limit in these hepatocytes, it was not possible to assess the effect of serum on this isoform.

Serum from humans with an URVI decreased in 4 hr the activity and total P450 content in control hepatocytes, without changing the amounts of CYP1A1, 1A2 and 3A6; after 24 h, the reductions in activity and total P450 content were more pronounced, and only the amount of CYP3A6 was reduced. In hepatocytes from rabbits with a TIAR, the serum decreased in 4h the activity and total P450 content, without affecting isoforms of P450; after 24 h, the effect on activity was greater, with decreases in amounts of CYP1A1 and 1A2. These results show that at the level of hepatic P450, 1) the first phenomenon to occur during inflammation is a decrease in P450 activity, a decrease that extends over the course of the inflammatory reaction; 2) after 24 h, a down-regulation becomes evident; 3) serum from humans with an URVI is more potent to reduce the activity and expression of cytochrome P450 than serum from rabbits with a TIAR; and 4) hepatocytes from rabbits with a TIAR are more sensitive to the effect of serum than hepatocytes from control rabbits.

Similar to our studies on the decrease in P450 activity, our last objective aimed to identify the serum mediators responsible for the down-regulation of hepatic P450. We observed that serum from rabbits and humans with an inflammatory reaction reduces the

mRNA levels for CYP1A1, 1A2 and 3A6: this repression was more pronounced at 48 h than at 24 h, and resulted in a decrease in amounts of the corresponding apoproteins. In rabbit serum, the fractions containing proteins of Mr 15-31 kDa down-regulated mRNAs and apoproteins of all three isoforms. Immuno-neutralization of the activity of specific cytokines demonstrated that IL-6 is involved in CYP1A1 down-regulation, while IL-1 β and IL-6 contribute to CYP1A2 and 3A6 down-regulation. In human serum, the fraction containing proteins with Mr 15-31 kDa also repressed CYP1A1 and 1A2. However, these fractions did not cause significant changes in the level of CYP3A6 mRNA, but decreased the amount of the apoprotein. Serum mediators involved in CYP1A1 and 1A2 down-regulation are IFN- γ and TNF- α and the four tested cytokines for CYP3A6. These results demonstrate that serum from subjects with an inflammatory reaction contains mediators capable to repress P450 isoforms and that these mediators are cytokines. The down-regulation of P450 isoforms by cytokines occurs mainly at the transcriptional level, which can account for the decrease in amount of proteins. In contrast, CYP3A6 is under a different control mechanism since exposure to human serum decreases transcription and translation.

Keywords : Cytochrome P450, inflammation, metabolism, cytokine, expression, rabbit, human, hepatocytes.

Contribution des auteurs aux manuscrits

Bleau AM, Levithchi M, Maurice H et 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* 130:1777-84, 2000.

Dans ces travaux, Mihaela Levithchi a vérifié l'effet de l'interleukine-6 sur le contenu total en P450, mesuré par spectrophotométrie, dans des hépatocytes provenant de lapins avec une réaction inflammatoire aiguë. Hélène Maurice a participé à l'isolation des hépatocytes de lapins pour culture cellulaire et à la mise au point de la technique de séparation des protéines sériques selon leurs poids moléculaires par HPLC sur une colonne analytique.

Bleau AM, Fradette C, El-Kadi AO, Côté MC et 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*, 29:1007-12, 2001.

Dans ce manuscrit, Ayman El-Kadi a conduit l'étude du métabolisme *in vivo* de la théophylline chez des patients avec une infection virale; Caroline Fradette et Marie-Claude Côté ont participé aux dosages de certains échantillons.

Bleau AM, Maurel P, Pichette V, Leblond F et du Souich P. Modulation of CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A4 expression by serum mediators released during a viral infection and a turpentine-induced inflammation.

Dans le laboratoire du Pr Maurel, j'ai préparé des sondes d'ADNc spécifiques pour les isoformes du P450 chez le lapin. François Leblond m'a enseigné la technique de buvardage de type Northern pour la mesure du niveau d'ARNm: j'ai effectué tous les dosages dans le laboratoire du Dr. Pichette.

Remerciements

Tout d'abord, un merci tout spécial à mon directeur de recherche, le Dr Patrick du Souich, pour m'avoir accueillie au sein de sa famille ... attention, j'y ai quadruplé le nombre de mes frères et sœurs. Merci pour son enseignement, ses conseils et critiques qui m'ont été précieux tout au long de la réalisation de ce projet. Je lui suis également reconnaissante de la grande latitude et de la confiance qu'il m'a accordées dans la conduite de mes travaux.

Un énorme merci aux deux techniciennes du laboratoire: Lucie Héroux et Hélène Maurice, pour leur support technique inestimable, leurs avis et conseils qui ont joué un rôle significatif dans la réalisation de cette thèse.

Merci aux étudiants de mon laboratoire, collaborateurs et gens du département pour leurs conseils éclairés et la résolution d'une multitude de tracas quotidiens. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon amitié les plus sincères. Merci à Ayman El-Kadi pour les études *in vivo* sur le métabolisme de la théophylline chez l'humain qui figurent dans mon 2^{ème} article. Merci également à Marie-Claude Côté pour ses nombreux dosages du P450, et bien sûr à Caroline Fradette pour les échanges fructueux en recherche et les moments de fou rire souvent salutaires.

Merci au Dr Vincent Pichette pour m'avoir permis d'effectuer mes trop nombreux "Northern blot" dans son laboratoire. Merci également au Pr. Patrick Maurel de son accueil

chaleureux dans son laboratoire, ainsi qu'aux étudiants pour l'aide dans la préparation des sondes d'ADNc...merci de m'avoir fait découvrir notre très chère mère patrie.

Merci à toute ma famille et amis proches (ils se reconnaîtront tous sans aucun doute), pour m'avoir encouragée tout au long de mon cheminement. Merci à vous, sans qui cette thèse n'aurait pas été la même.

Finalement, je tiens à souligner le support financier du Fonds de la recherche en santé du Québec, de la Faculté des études supérieures et des compagnies Merck Frosst Inc. et Glaxo : les bourses qu'ils m'ont octroyées ont été un encouragement à poursuivre mes études.

Table des matières

Liste des tableaux	xx
Liste des figures	xxi
Liste d'abréviations	25
PREMIÈRE PARTIE: REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	27
CHAPITRE 1. LE CYTOCHROME P450	28
1.1 Définition et historique	29
1.2 Mécanisme d'action	31
1.3 Organisation structurale du système du cytochrome P450	35
1.4 Cycle catalytique du cytochrome P450.....	36
1.5 Les familles et sous-familles du cytochrome P450.....	38
1.5.1 La famille du CYP1	38
1.5.2 La famille du CYP2	39
1.5.3 La famille du CYP3	42
1.5.4 La famille du CYP4	43
1.6 La théophylline et ses usages	44
CHAPITRE 2. LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITÉ DES ISOFORMES DU CYTOCHROME P450.	47
2.1 Aspects généraux	48
2.1.1 Les facteurs reliés à l'organisme.....	49
2.1.2 La régulation au niveau cellulaire.....	51
2.1.3 La régulation au niveau membranaire.....	56
2.1.4 La régulation au niveau moléculaire.....	57
CHAPITRE 3. L'INFLAMMATION	58
3.1 Définition	59
3.2 La réaction inflammatoire locale	59
3.3 L'infection virale	61
3.4 Les médiateurs de l'inflammation.....	62

3.4.1 Le système du complément.....	62
3.4.2 Les cytokines.....	63
3.4.3 Cytokines antivirales.....	65
3.4.4 Les substances oxygénées réactives (SOR)	65
CHAPITRE 4. L'EFFET DE L'INFLAMMATION SUR LE MÉTABOLISME DES MÉDICAMENTS ET LE CYTOCHROME P450	69
4.1 Pertinence clinique.....	70
4.2 Études chez l'humain.....	71
4.3 Études chez l'animal	73
4.3.1 L'inflammation locale	73
4.3.2 Les infections bactériennes et parasitaires	74
4.3.3 L'infection virale et les inducteurs de l'interféron	75
4.4 L'effet de l'inflammation sur le cytochrome P450.....	75
4.4.1 Les isoenzymes individuelles.....	75
4.4.2 L'expression génique des isoformes du P450	76
4.4.3 L'activité du P450.....	80
4.5 Les mécanismes de régulation du cytochrome P450	80
4.5.1 La régulation au niveau des transcrits.....	81
4.5.2 La régulation au niveau de la protéine	83
Objectifs généraux des travaux	84
Objectifs spécifiques des travaux de doctorat.....	85
CHAPITRE 5. CYTOCHROME P450 INACTIVATION BY SERUM FROM HUMANS WITH A VIRAL INFECTION AND SERUM FROM RABBITS WITH A TURPENTINE-INDUCED INFLAMMATION: THE ROLE OF CYTOKINES	88
Summary	89
Introduction.....	91
Materials and Methods.....	93
Hepatocyte isolation and culture.....	93
Rabbit and human serum preparation	94

Fractionation of serum proteins	94
Determination of cytochrome P450 content	95
Western Blot analysis.....	96
Immuno-neutralization of cytokines	96
Effect of IL-6 on P450 content.....	97
Drugs and chemicals	98
Statistical analysis	98
Results.....	99
Effect of the inflammatory reaction on P450 content and activity and amount of P450 isoforms	99
Effect of serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction and HPLC fractions on P450 content and activity	99
Effect of serum from humans with a viral infection and HPLC fractions on P450 content and activity	100
Identification of the mediators in serum from rabbits with an inflammatory reaction responsible for the inactivation of the P450.....	101
Identification of mediators in serum from humans with a viral infection responsible for the inactivation of the P450.....	102
Discussion	102
Acknowledgements.....	106
References.....	106
CHAPITRE 6. CYTOCHROME P450 DOWN-REGULATION BY SERUM FROM HUMANS WITH A VIRAL INFECTION AND FROM RABBITS WITH AN INFLAMMATORY REACTION.....	119
Abstract	120
Introduction.....	121
Materials and Methods.....	124
Collection of hepatocytes and serum from rabbits.....	125
Collection of serum from human	125

Cytochrome P450 content and activity	125
Western blot analysis	126
Drugs and chemicals	127
Statistical analysis	127
Results.....	127
Effect of a TIAR on P450 content, activity and amount of P450 apoproteins.....	127
Effect of RS _{CONT} and RS _{TIAR} on P450 of H _{CONT} following 4 and 24 h of incubation.	128
Effect of RS _{CONT} and RS _{TIAR} on P450 of H _{INFLA} following 4 and 24 h of incubation.	129
In vivo effect of an URVI on the metabolism of theophylline in human volunteers	129
Effect of HS _{CONT} and HS _{URVI} on P450 of H _{CONT} following 4 and 24 h of incubation.	130
Effect of HS _{CONT} and HS _{URVI} on P450 of H _{INFLA} following 4 and 24 h of incubation.....	130
Discussion	132
References	135
CHAPITRE 7. DOWN-REGULATION OF CONSTITUTIVE CYP1A1, CYP1A2 AND CYP3A6 EXPRESSION BY HUMAN AND RABBIT INFLAMMATORY SERUM MEDIATORS IN PRIMARY CULTURE RABBITS HEPATOCYTES.148
Abstract	149
Introduction.....	151
Materials and methods	151
Hepatocyte isolation and culture conditions.	152
Preparation of rabbit and human serum	152
Fractionation of serum proteins	154
Immuno-neutralization of cytokines	155
Measurement of cytokines in serum	156

Measurement of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins.....	156
Preparation of cDNA probes.....	157
Northern blot analysis.....	158
Drugs and chemicals.....	158
Statistical analysis.....	159
Results.....	159
In vivo effect of the TIIR on hepatic P450 apoproteins and mRNAs.....	160
Effect of RS _{TIIR} and HPLC fractions on P450 expression in H _{CONT}	160
Identification of the mediators in RS _{TIIR} responsible for the down-regulation of P450 isoforms.....	161
Effect of HS _{URVI} and HPLC fractions on P450 expression in H _{CONT}	161
Identification of the mediators in HS _{URVI} responsible for the down-regulation of P450.....	163
Presence of cytokines in human serum and repressive effect of recombinant human cytokines.....	163
Discussion.....	164
Legends for figures.....	186
CHAPITRE 8. DISCUSSION.....	190
Les modèles d'inflammation.....	191
Les médiateurs de la diminution d'activité du P450.....	194
Les médiateurs de la régulation négative du P450.....	195
Les facteurs humoraux et types cellulaires impliqués dans la régulation négative du cytochrome P450.....	202
Les cytokines: utilisation de souris knock-out.....	202
Les hormones.....	204
L'alimentation.....	205
Le rôle des cellules de Kupffer.....	205
Les voies de signalisation pouvant mener à la diminution d'activité et à la régulation négative du cytochrome P450 par les cytokines.....	206

Les voies de transduction du signal par l'IL-6, l'IL-1 β , l'IFN- γ et le TNF- α	206
Le rôle des protéine kinases dans la diminution d'activité et la régulation négative du cytochrome P450 par les cytokines.....	210
Le rôle des SOR dans la diminution d'activité ainsi que la répression du P450 dans l'inflammation.	212
Les voies de transduction du signal par les SOR menant à la diminution de l'activité et la répression du P450 induites par l'inflammation.....	215
Les facteurs de transcription et récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation négative du cytochrome P450	219
Les facteurs de transcription enrichis hépatiques.....	221
Le rôle des récepteurs orphelins dans la régulation négative du cytochrome P450.....	222
Les états pathologiques et la régulation du cytochrome P450	223
La finalité de la régulation négative du cytochrome P450.....	225
Travaux futurs	229
Conclusion	231
Références.....	233
Annexes	
Résumé: 1 ^{er} manuscrit.....	259
Résumé: 2 ^{ème} manuscrit.....	260
Résumé: 3 ^{ème} manuscrit.....	261

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Réactions de biotransformation spécifiques de substrats par les principales isoformes du cytochrome P450 chez l'humain.....	34
Tableau 3.1	Sources cellulaires et mécanismes d'action des différentes cytokines produites lors d'une réaction inflammatoire.....	64
Tableau 4.1	Effet de l'inflammation sur l'expression du cytochrome P450.....	78
Tableau 4.2	Effet des cytokines sur l'expression du cytochrome P450.....	79
Table 5.1	Effect of serum from rabbits and humans on the ability of the hepatocytes to biotransform theophylline.....	113
Table 6.1	Effect of serum from rabbits with an inflammatory reaction on P450 content and ability to biotransform theophylline.....	141
Table 6.2	Effect of serum from rabbits with an inflammatory reaction on P450 content and ability to biotransform theophylline incubated for 4 and 24 h with hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction.....	144
Table 6.3	Effect of serum from control subjects and volunteers with an upper respiratory tract viral infection reaction on the ability of hepatocytes from control rabbits and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction to biotransform theophylline after a 4 and 24 h period of incubation.....	145
Table 7.1	Effect of several cytokines on the expression of CYP1A1, 1A2 and 3A6 depending upon the nature of the inflammatory reaction.....	185
Tableau 8.1	Voies de transduction du signal menant à la diminution d'activité et à la régulation négative du cytochrome P450.....	213

Liste des figures

- Figure 1.1 Exemples des différentes voies de biotransformation catalysées par le système des mono-oxygénases32
- Figure 1.2 Schéma représentant les principales étapes de la réaction d'hydroxylation de substrats catalysée par le P450.....37
- Figure 1.3 Métabolisme de la théophylline par les enzymes du cytochrome P450.....46
- Figure 5.1 Effect of a turpentine-induced inflammatory reaction on the relative amounts of hepatic CYP1A1, 1A2, and 3A6 immunoreactive proteins in rabbits, 48 h after the s.c. injection of turpentine. H_{CONT} and H_{INF} are hepatocytes of control rabbits and rabbits with an inflammatory reaction, respectively.....112
- Figure 5.2 Effect of concentrated x1.25 HPLC fractions of serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{INF}) ($n = 6$) on cytochrome P450 content in hepatocytes of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INF}) following 4 h of incubation. HPLC fractions are designated by the Mr of proteins contained in each fraction. * $p < 0.05$ compared with P450 content in H_{INF}114
- Figure 5.3 Effect of serum and concentrated HPLC fractions on the amount of CYP1A1 and 1A2 apoproteins of hepatocytes from a representative rabbit with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INF}). H_{INF} were incubated for 4 h in the presence of serum and concentrated x1.25 HPLC fraction from turpentine-treated rabbit (RS_{INF}) (A), and of serum from one representative human with an upper respiratory tract viral infection and HPLC fraction (HS_{INF}) (B). HPLC fractions are designated by the Mr of proteins contained in each fraction.....115
- Figure 5.4 Effect of concentrated x1.25 HPLC fractions of serum from subjects with an upper respiratory tract viral infection (HS_{INF}) ($n = 6$) on cytochrome P450 content in hepatocytes of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INF}) following 4 h of incubation. HPLC fractions are designated by the Mr of proteins contained in each fraction. * $p < 0.05$ compared with P450 content in H_{INF}116

- Figure 5.5 Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{INF}) ($n = 7$) and of the Mr 23-15 kDa HPLC fraction to reduce P450 content. H_{INF} are hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction. * $p < 0.05$ compared with P450 content in H_{INF}117
- Figure 5.6 Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of serum from humans with an upper respiratory viral infection (HS_{INF}) ($n = 8$), and of the Mr >95 kDa HPLC fraction to reduce P450 content. H_{INF} are hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction. * $p < 0.05$ compared with P450 content in H_{INF}118
- Figure 6.1 Effect of a turpentine-induced inflammatory reaction on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from control (H_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INFLA}), 48 h after the injection of turpentine. Numbers indicate densitometry values.142
- Figure 6.2 Effect of serum from control (RS_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{INFLA}) on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INFLA}), after a 24 h period of incubation. Numbers indicate densitometry values.....143
- Figure 6.3 Amount of 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) recovered in a 24 h urinary collection from 5 volunteers with and without an upper respiratory viral infection after oral intake of 300 mg of theophylline.....146
- Figure 6.4 Effect of serum from volunteers with (HS_{URVI}) and without (HS_{CONT}) an upper respiratory tract viral infection reaction on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INFLA}), after a 24 h period of incubation. Numbers indicate densitometry values.....147
- Figure 7.1 Representative bands illustrating the amounts of CYP1A1, 1A2 and 3A6 and their mRNAs in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{THR}), 48 h after the injection of turpentine.174

- Figure 7.2 Effect of serum from control rabbits (RS_{CONT}) and from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{THIR}) on CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins ($n = 7$), as well as on *CYP1A1*, *1A2* and *3A6* mRNA amounts ($n = 6$) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. The two forms of *CYP3A6* mRNA (1.85 kb, 1.7 kb) are shown. The upper panel of the figure illustrates representative gels. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control. * $p < 0.05$ compared with RS_{CONT}175
- Figure 7.3 Effect of serum from control rabbits (RS_{CONT}), serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{THIR}) and HPLC fractions of RS_{THIR} on CYP1A1 apoprotein ($n = 7$) and *CYP1A1* mRNA ($n = 3$) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. The upper panel of the figure illustrates representative gels. Values on the abscissa correspond to M_r of the proteins contained in each HPLC fraction. See figure 7.2 for details.....176
- Figure 7.4 Effect of serum from control rabbits (RS_{CONT}), serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{THIR}) and HPLC fractions of RS_{THIR} on CYP1A2 apoprotein ($n = 4$) and *CYP1A2* mRNA ($n = 3$) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. See figure 7.2 and 7.3 for details.....177
- Figure 7.5 Effect of serum from control rabbits (RS_{CONT}), serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{THIR}) and HPLC fractions of RS_{THIR} on CYP3A6 apoprotein ($n = 4$) and *CYP3A6* mRNA ($n = 3$) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. See figure 7.2 and 7.3 for details.....178
- Figure 7.6 Effect of anti-cytokine antibodies (Ab) on the ability of the 15-31 kDa HPLC fraction of serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{THIR}) to reduce the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins after 48 h of incubation with hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}), ($n = 4$). The upper panel of the figure illustrates representative gels. RS_{CONT} : serum from control rabbits. Values on the abscissa correspond to M_r of the proteins contained in each HPLC fraction. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control. * $p < 0.05$ compared with RS_{CONT}179

- Figure 7.7 Effect of human serum from controls (HS_{CONT}) and subjects with an upper respiratory tract viral infection reaction (HS_{URVI}), and of HPLC fractions of HS_{URVI} on CYP1A1 apoprotein (n = 4) and *CYP1A1* mRNA (n = 3) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. The upper panel of the figure illustrates representative gels. Values on the abscissa correspond to M_r of the proteins contained in each fraction. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control. * $p < 0.05$ compared with HS_{CONT} 180
- Figure 7.8 Effect of human serum from controls (HS_{CONT}) and subjects with an upper respiratory tract viral infection reaction (HS_{URVI}), and of HPLC fractions of HS_{URVI} on CYP1A2 apoprotein (n = 4) and *CYP1A2* mRNA (n = 3) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. See figure 7.7 for details..... 181
- Figure 7.9 Effect of human serum from controls (HS_{CONT}) and subjects with an upper respiratory tract viral infection reaction (HS_{URVI}), and of HPLC fractions of HS_{URVI} on CYP3A6 apoprotein (n = 4) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. See figure 7.7 for details..... 182
- Figure 7.10 Effect of anti-cytokine antibodies (Ab) on the ability of the 15-31 kDa HPLC fraction of serum from volunteers with an upper respiratory tract viral infection reaction (HS_{URVI}) to reduce the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins after a 48 h of incubation with hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}). The upper panel of the figure illustrates representative gels. Values on the abscissa correspond to M_r of the proteins contained in each fraction. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control. * $p < 0.05$ compared with HS_{CONT} 183
- Figure 7.11 Effect 0, 2.5, 5 and 10 ng/ml of recombinant human IL-6 (lanes 1 to 4) and of the combination of IL-6, IL-1 β , TNF- α and IFN- γ (5 ng/ml) on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins after a 48 h period of incubation with hepatocytes from control rabbits..... 184
- Figure 8.1 Voies de transduction du signal par les cytokines..... 208
- Figure 8.2 Mécanismes sous-jacents à la diminution de l'activité et de la répression du P450..... 218

Liste d'abréviations

AA: acide arachidonique

AAH: "aryl hydrocarbon hydroxylase"

Ah: "aryl hydrocarbon"

ARE: "AU-rich element"

Arnt: "aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator"

C (3, 5): complément (3, 5)

CAR: "constitutively activated receptor"

c-myc: proto-oncogène "cellular-myelocytomatosis"

DMTU: diméthylthiourée

Epo: érythropoïétine

EROD: "ethoxyresorufin O-dealkylation"

FAD: flavine adénine dinucléotide

FMN: flavine mononucléotide

GSH: glutathion réduit

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

HIF-1: facteur activateur de la transcription inductible par l'hypoxie

HSP: "heat shock protein"

IL-1 β : interleukine 1bêta

IL-6: interleukine 6

IFN- α : interféron- α

IFN- γ : interféron- γ

JAK: "janus tyrosine kinase"

LC: leucotriène

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

LPS: lipopolysaccharides

MAPK: "mitogen activated protein kinase"

MROD: "methoxyresorufin O-demethylation"

NAC: N-acétylcystéine

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF- κ B: facteur nucléaire-kappa B

NPS: nitroprussiate de sodium (nitroferricyanure)

NO: oxyde nitrique

NOSi: NO synthase inductible

O₂: oxygène atmosphérique

·O₂⁻: anion superoxyde

OH: radical hydroxyle

P450: cytochrome P450

PKA; C: protéine kinase A; C

PLA2: phospholipase A2

PPA: protéines plasmatiques de la phase aiguë

PPAR: "peroxysome-proliférateur-activated receptor"

PTK: protéine tyrosine kinase

PXR: "pregnane X receptor"

SOR: substances oxygénées réactives

STAT: "signal transduction and activation of transcription"

TBARS: substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique

TCDD: tétrachlorodibenzo-p-dioxine

TGF- β : facteur de croissance et de transformation

TNF- α : facteur de nécrose tumorale

RH: substrat

XRE: élément de réponse aux xénobiotiques

PREMIÈRE PARTIE

REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1

LE CYTOCHROME P450

1. LE CYTOCHROME P450

1.1 Définition et historique

L'organisme humain élimine une multitude de substances endogènes et exogènes grâce à son système de monooxygénases qui catalyse la biotransformation de substances lipophiles en composés plus polaires et donc plus facilement éliminables. La littérature actuelle utilise le terme cytochrome P450 (P450) pour désigner ce système. Les enzymes du P450 constituent une superfamille d'hémoprotéines et se localisent principalement aux membranes du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques; on en retrouve également dans d'autres organes tels que l'intestin, le rein, le cerveau et les gonades où elles y remplissent des fonctions spécifiques (Benet LZ et coll., 1995).

Les premières recherches concernant le métabolisme des xénobiotiques ont débuté vers la fin des années 40. À cette époque, des pharmacologues ont observé que le temps de sommeil induit par l'hexobarbital, aujourd'hui reconnu pour être biotransformé par le CYP2B1 hépatique, pouvait servir d'indicateur du taux de métabolisme de plusieurs autres médicaments. Par la suite, le développement de l'ultracentrifugation a permis la séparation des fractions subcellulaires d'homogénats de tissus pour la localisation intracellulaire de différents systèmes enzymatiques. Le laboratoire du Docteur Brodie a été l'un des premiers à employer ces méthodes dans l'étude du métabolisme de composés chimiques et à extrapoler ces résultats aux observations faites *in vivo* (Bernhardt R, 1996). L'étape importante dans la découverte du cytochrome P450 date de 1955: Axelrod et Brodie ont identifié un système enzymatique dans le réticulum endoplasmique du foie de porc et de rat qui a la capacité d'oxyder plusieurs composés (Axelrod J, 1955; Brodie BB et coll., 1955). Ils ont observé que le système enzymatique NADPH-dépendant (qui

participe aux réactions d'oxydation de plusieurs médicaments et aujourd'hui désigné comme la NADPH cytochrome P450 réductase) était associé à la fraction microsomale du foie (Estabrook RW et coll., 1996).

En 1958, Garfinkel et Klingenberg ont détecté un pigment capable de lier le CO dans des microsomes de foie après sa réduction en présence de NADPH ou de dithionite, le maximum d'absorption de ce complexe dans le visible se situe à 450 nm (Garfinkel, 1958; Klingenberg M, 1958). Le terme "cytochrome P450" dérive donc du spectre d'absorption de ce complexe; cette capacité du P450 à lier le CO sert couramment dans la mesure du contenu total en P450 (Omura T et Sato R, 1964). Le P450 fut alors identifié comme étant une hémoprotéine à bas spin capable de lier différents substrats (Hashimoto Y et coll., 1962).

Mais comment le cytochrome P450 peut-il métaboliser une si grande diversité de substrats? Ce n'est que 10 ans plus tard, en 1968, que les équipes de Gunsalus et Coon réussirent à percer cette énigme: le système est en réalité composé de plusieurs protéines différentes (Katagiri M et coll., 1968; Lu AY et Coon MJ, 1968). Deux grandes classes générales d'enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif furent alors déterminées durant les années 60: les oxydases qui transfèrent un électron d'un substrat à l'O₂, et les oxygénases qui insèrent l'O₂ dans le substrat. Le terme mono-oxygénase a été le plus conservé pour désigner les réactions d'oxygénation: un atome de la molécule d'O₂ est incorporé dans le substrat, avec réduction concomitante de l'autre atome pour former une molécule d'eau. Il est maintenant bien établi que les réactions d'oxydation réalisées par le cytochrome P450, suivies des réactions de phase II, rendent les composés plus polaires afin de favoriser leur élimination (Bernhardt R, 1996).

La découverte de l'existence de plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme ouvrit alors la voie aux travaux de purification et de caractérisation des composantes du système du cytochrome P450. Plusieurs isoformes ont été isolées de différents tissus chez plusieurs espèces; en 1982, on parvint à déterminer les séquences primaires de deux d'entre elles (Fujii-Kuriyama Y et coll., 1982; Haniu M et coll., 1982). En 1996, on dénombrait plus de 300 gènes différents de la famille du P450 (Guengerich FP, 1996).

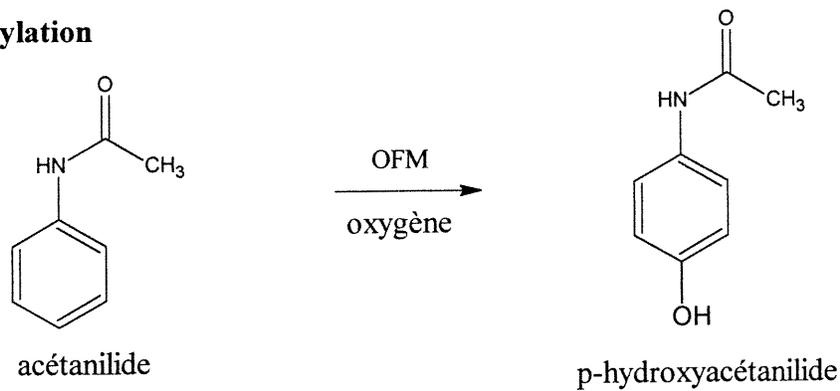
1.2 Mécanisme d'action

Les enzymes du P450 sont impliquées dans le métabolisme de plusieurs substances endogènes et xénobiotiques. Elles catalysent en effet des réactions aussi diverses que l'hydroxylation, la N-, la O- et la S-désalkylation, la sulfoxydation, l'époxydation, la désamination, la déshalogénéation, la peroxydation et la réduction de composés N-oxydés. Les principales réactions sont illustrées dans la figure 1.1. Notons que les substrats incluent les acides gras libres, les stéroïdes et les prostaglandines ainsi que plusieurs médicaments, des solvants organiques, l'éthanol, des produits de type hydrocarbure d'alkylaryle, des pesticides et des agents carcinogènes. De plus, un substrat peut être métabolisé par plus d'une enzyme. Le P450 est donc versatile et peut catalyser quelque 60 types de réactions chimiques, avec génération de plusieurs types de produits, principalement des dérivés hydroxylés. Le tableau 1.1 présente des exemples de conversion de substrats selon le type de réaction (Riddick DS, 1998).

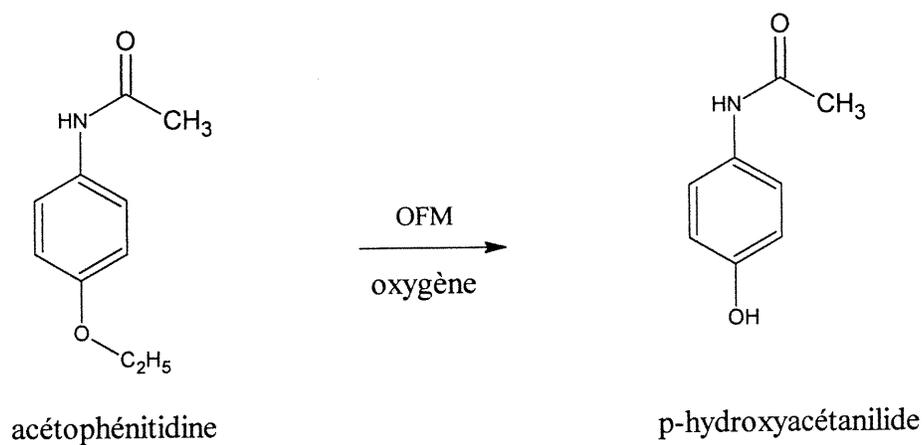
Figure 1.1

Exemples des différentes voies de biotransformation catalysées par le système de mono-oxygénase à fonction mixte

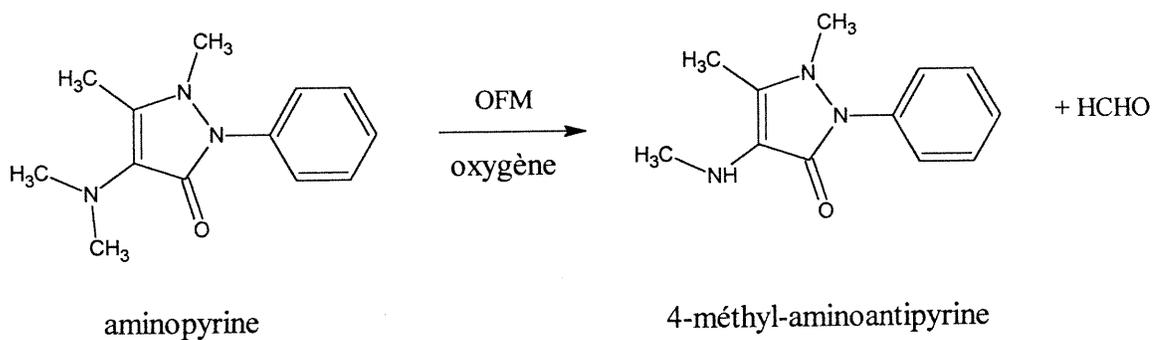
Hydroxylation



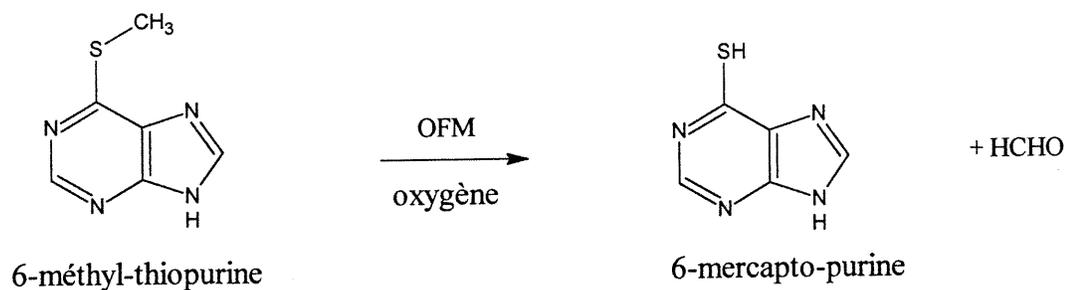
O-déalkylation

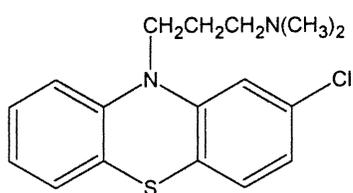


N-déméthylation

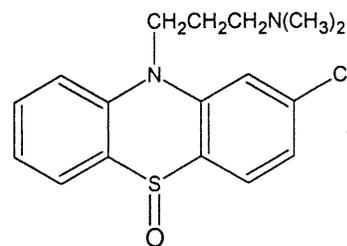
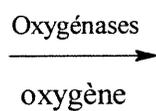


S-déméthylation

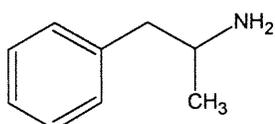


Sulfoxydation

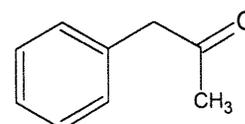
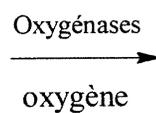
chlorpromazine



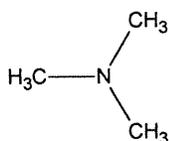
sulfoxyde de chlorpromazine

Désamination

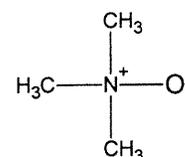
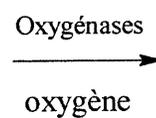
amphétamine



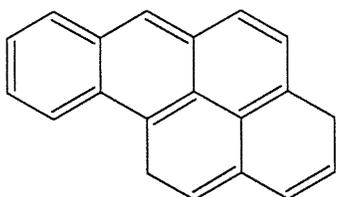
phénylacétone

Réduction de composés N-oxydé

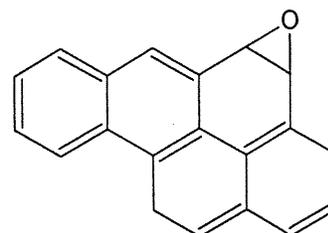
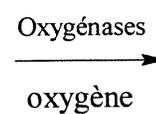
triméthylamine



N-oxyde de triméthylamine

Époxydation

benzo(a)pyrène



benzo(a)pyrène 4,5-oxyde

Tableau 1.1
Réactions de biotransformation catalysées
par les principales isoformes du cytochrome P450 chez l'humain

Familles	Sous-familles	Gènes	Substrats	Inducteurs	Réaction enzymatique
CYP1	CYP1A	<i>CYP1A1</i> <i>CYP1A2</i>	Benzo[a]pyrène, HPA, 7-Éthoxycoumarine Théophylline, Caféine	HPA β- Naphtoflavone	7-Éthoxyrésorufine, O-dééthylase O-dééthylase
CYP2	CYP2A	<i>CYP2A1</i> <i>CYP2A6</i> <i>CYP2A7</i>	Stéroïdes Coumarine	Phénobarbital	Hydroxylase
	CYP2B	<i>CYP2B1</i> <i>CYP2B2</i> <i>CYP2B6</i>	Hexobarbital, Phénobarbital, Cyclophosphamide	Phénobarbital	Pentoxyrésorufine O-dépentylase
	CYP2C	<i>CYP2C8</i> <i>CYP2C9</i> <i>CYP2C18</i> <i>CYP2C19</i>	Phénytoïne, Warfarine, Tolbutamide, S-warfarine, Méphénytoïne, Diazépam, Oméprazol	Barbituriques Rifampicine	Hydroxylase
	CYP2D	<i>CYP2D6</i>	Métoprolol, Débrisoquine, Codéine	Non inductible	Débrisoquine 4- hydroxylase
	CYP2E	<i>CYP2E1</i>	Nitrosodiméthylamine, Aniline	Éthanol	N-déméthylase Hydroxylation
CYP3	CYP3A	<i>CYP3A1</i> <i>CYP3A3</i> <i>CYP3A4</i> <i>CYP3A5</i>	Stéroïdes Nifédipine Cyclosporine Testostérone	Prégnénolone Prégnénolone	Hydroxylase Oxydase
CYP4	CYP4A	<i>CYP4A1</i> <i>CYP4A4</i>	Acides gras, Acide arachidonique, Prostaglandines	clofibrate proliférateurs du peroxyosome	ω-hydroxylation

HPA : hydrocarbures polycycliques aromatiques

Il devient évident que cette large diversité de substrats et de types de réactions requiert de nombreuses isoformes du P450. La première classification des membres de la famille du cytochrome P450 remonte à 1991, laquelle cataloguait 154 gènes différents (Paine AJ, 1991). Avec approximativement 300 isoformes actuellement répertoriées, une nouvelle nomenclature s'imposait. Ainsi, dans les banques de données, le préfixe CYP sert à désigner la superfamille des P450 en tant qu'hémoprotéines; le premier chiffre arabe définit la famille du gène; la lettre suivante la sous-famille; et finalement le second chiffre une enzyme en particulier. Notons que les membres d'une même famille de gènes présentent généralement des séquences à plus de 40% d'identité à celles d'autres familles. Dans une même sous-famille, les gènes du P450 montrent plus de 55% d'identité de séquence (Guengerich FP, 1996).

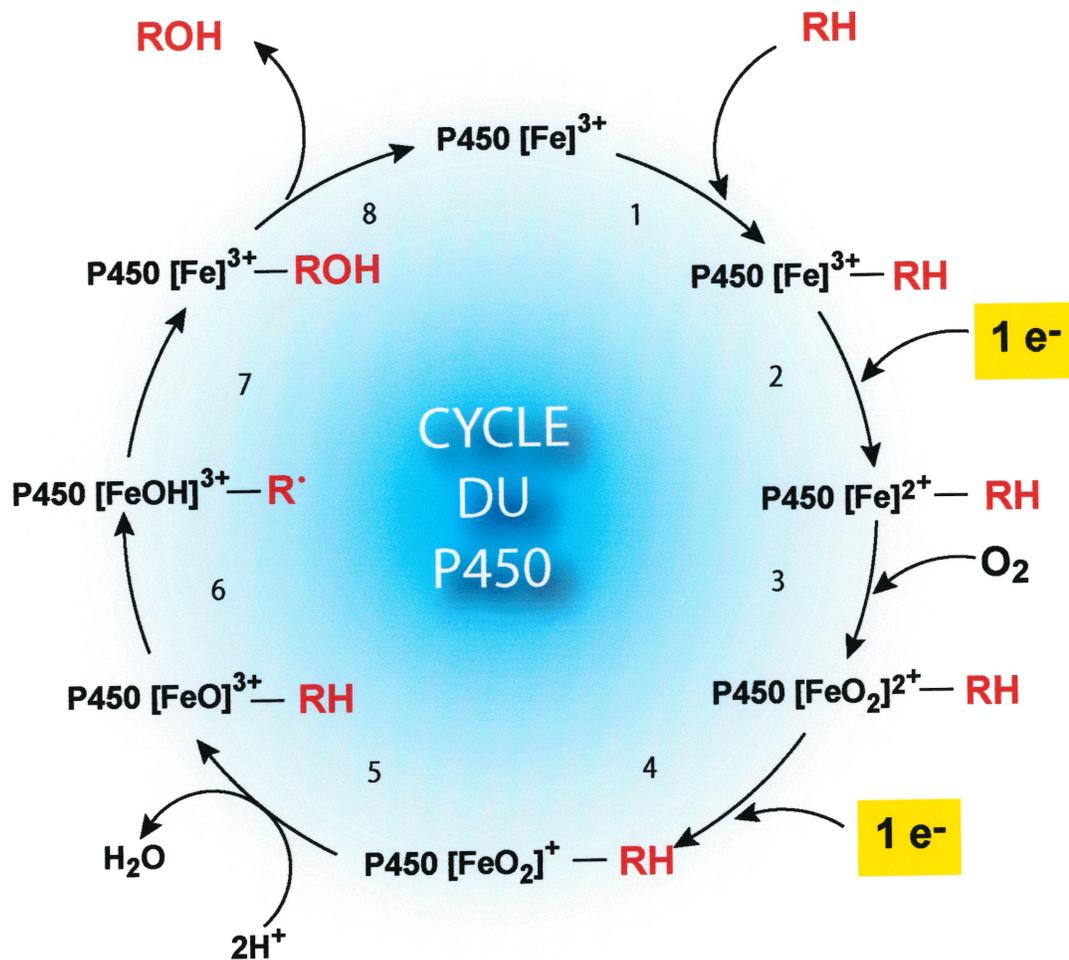
1.3 Organisation structurale du système du cytochrome P450

Les réactions d'oxydation, effectuées particulièrement par les oxydases microsomales à fonction mixte, représentent la majorité des biotransformations impliquant le P450. Ce système de monooxygénases est lié à la membrane du réticulum endoplasmique lisse et requiert la participation de deux protéines ancrées dans la bicouche lipidique: le cytochrome P450 de la superfamille des hémoprotéines et la NADPH-cytochrome P450 réductase qui contient des domaines FAD et FMN. Ces domaines transfèrent un électron du cofacteur NADPH à l'hémoprotéine pour l'activation de l'oxygène et l'hydroxylation subséquente du substrat (Riddick DS, 1998).

1.4 Cycle catalytique du cytochrome P450.

Le schéma de la figure 1.2 illustre les principales étapes de la réaction d'hydroxylation de substrats catalysée par le P450. L'hémoprotéine se trouve initialement sous la forme dite oxydée (Fe^{3+}). (1) Dans un premier temps, le substrat (RH) se lie au P450 pour former un complexe binaire. Cette liaison du substrat induit un changement conformationnel du P450 qui modifie le potentiel réducteur et le spectre d'absorption de l'hémoprotéine, ainsi que l'affinité entre les différentes composantes du système du P450. (2) La seconde étape du cycle met en jeu le transfert d'un électron du cofacteur NADPH via la flavoprotéine NADPH-cytochrome P450 réductase; cet électron réduit la portion hème du P450 liée au substrat en sa forme ferreuse (Fe^{2+}), alors que la réductase microsomale est oxydée en un radical semiquinone stable. La NADPH-cytochrome P450 réductase utilise le FAD et le FMN pour effectuer le transfert d'électrons. (3) Dans la troisième étape, la réduction du fer permet à une molécule d'oxygène de se lier à l'ion ferreux du complexe P450-substrat pour générer un produit tertiaire, il s'en suit un réarrangement électronique. (4) La quatrième étape comprend le transfert d'électrons nécessaires à l'activation de l'oxygène lié (ici, l'équivalent réducteur peut provenir de deux sources: la flavoprotéine NADPH-cytochrome P450 réductase ou le NADH via la flavoprotéine NADH-cytochrome b_5 réductase). (5) Le lien dioxygène est ensuite clivé, avec prise de deux protons pour générer une molécule d'eau et un oxygène activé. Le complexe fer-oxygène restant se voit alors converti en un intermédiaire radicalaire fer-oxo (Fe-O^{3+}). (6) Un hydrogène est ensuite enlevé du substrat pour former un hydroxyle, (7) lequel se recombine en la forme hydroxylée du produit (ROH). (8) La réaction se termine par dissociation du substrat hydroxylé et régénération du cytochrome P450 sous sa forme ferrique. Notons que l'activité réductase s'avère l'étape limitante car on compte 20 molécules de P450 par molécule de réductase (Bernhardt R, 1996).

Figure 1.2
Schéma représentant les principales étapes de la réaction d'hydroxylation de substrats catalysée par le P450



- ① Formation du complexe enzyme-substrat
- ② Transfert du premier électron
- ③ Liaison d'une molécule d'oxygène au fer ferreux
- ④ Transfert du deuxième électron
- ⑤ Clivage du lien dioxygène
- ⑥ Suppression d'un hydrogène du substrat
- ⑦ Transfert de l'atome d'oxygène au substrat
- ⑧ Dissociation du produit hydroxylé

1.5 Les familles et sous-familles du cytochrome P450

On divise le système du cytochrome P450 en 14 familles principales. Les sous-familles des CYP1A et 3A seront décrites en détail car elles font l'objet de cette thèse.

1.5.1 La famille du CYP1

La famille du CYP1 réunit deux sous-familles : celles du CYP1A et du CYP1B. La sous-famille du CYP1B a été découverte en 1994, et on ne possède que peu d'information à son sujet. La sous-famille du CYP1A comprend deux membres : le CYP1A1 et le CYP1A2 dont les homologues sont retrouvés chez plusieurs espèces animales dont l'humain, le singe, le chien, le rat, le lapin et la souris. L'expression constitutive du CYP1A1 dans le foie est faible mais augmente après exposition à des inducteurs tels le 3-méthylcholanthrène et le TCDD (tétrachlorodibenzo-p-dioxine). Le CYP1A2, quant à lui, est constitutivement exprimé dans le foie et répond aux mêmes inducteurs. On retrouve également ces isoformes dans plusieurs tissus extrahépatiques comme les poumons et l'intestin. En général, la sous-famille du CYP1A est impliquée dans le métabolisme oxydatif de substances exogènes – tels les hydrocarbures polycycliques – et joue donc une fonction métabolique importante en regard de la mutagenèse et de la carcinogenèse. Les substrats typiques sont le benzo[a]pyrène pour le CYP1A1, et l'acétanilide ainsi que les xanthines telles la caféine et la théophylline pour le CYP1A2 (Kawajiri K et Hayashi SI, 1996). Le mécanisme d'induction du CYP1A1, et possiblement du CYP1A2, est sous régulation du locus Ah ("Aryl hydrocarbon"), et implique le récepteur cytosolique Ah qui, par le biais d'un récepteur nucléaire, le Arnt ("Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator"), active la transcription du gène. Plusieurs domaines dans le gène, principalement dans la région 5' flanquante, sont

impliqués dans le contrôle de la transcription, dont un élément de réponse positif aux xénobiotiques et un élément de réponse négatif qui réprime la transcription du gène (Whitlock JP, 1999). Le gène *CYP1A2* contient un site AP-1 qui peut interagir avec l'élément de réponse au récepteur Ah (site XRE: "xenobiotic response element").

Les homologues des enzymes du CYP1A1 et CYP1A2 retrouvés chez plusieurs espèces animales partagent une grande similarité de structure. Pour les expériences d'immunobuvardage, il devient important de souligner que chez l'humain, le CYP1A1 a un P.M. de 58,17 kDa et le CYP1A2 de 58,08 kDa ; chez le lapin, ces valeurs sont de 58,28 et 58,34 kDa respectivement (Kawajiri K et Hayashi SI, 1996).

1.5.2 La famille du CYP2

La famille du CYP2 comprend plusieurs membres dont le CYP2A, 2B, 2C, 2D et 2E.

La sous-famille du CYP2A

La sous-famille du CYP2A englobe au moins 12 membres distincts : les CYP2A1, 2A2 et 2A3 que l'on retrouve chez le rat; les CYP2A10 et 2A11 chez le lapin et les CYP2A6 et 2A7 chez l'humain. Bien que ces isoformes présentent plus de 55% d'identité de séquence, elles diffèrent considérablement quant à leurs niveaux de régulation, d'induction et d'inhibition, leur spécificité de substrats ainsi que leur distribution tissulaire. Par exemple, le CYP2A1, retrouvé dans le foie et les gonades de rats, catalyse la réaction de 7α -hydroxylation de la testostérone et de la progestérone. Il est induit par le 3-méthylcholantène, le β -naphtoflavone et les biphenylpolychlorés. Le CYP2A2, quant à lui, hydroxyle préférentiellement les stéroïdes en position 15. Il est à

noter que chez l'humain, ces isoformes participent également au métabolisme de xénobiotiques tels la coumarine et le fadrozole (Chang TKH et Waxman DJ, 1996).

La sous-famille du CYP2B

La sous-famille du CYP2B est généralement associée à l'induction au phénobarbital chez les rongeurs : chez le rat, on observe par exemple une augmentation considérable des niveaux d'ARNm codant pour les CYP2B1 et 2B2, et en conséquence de la quantité de protéines immunoréactives et l'activité catalytique associée. Cette réponse est en fait pléiotropique car l'expression de plusieurs isoformes et protéines impliquées dans le métabolisme répondent à l'induction. Effectivement, l'exposition au phénobarbital entraîne une augmentation de la liaison de protéines à l'élément de réponse au phénobarbital de l'ADN, comme dans le cas du récepteur nucléaire CAR ("constitutively activated receptor") (Honkakoski P et Negishi M, 2000). Le CYP2B1 contribue de manière importante au métabolisme de plusieurs médicaments lipophiles et stéroïdiens. La sous-famille du CYP2B est également responsable de l'activation de différentes substances dont le bromobenzène, la cocaïne et le CCl₄, phénomène influencé par l'induction de ces isoformes par le phénobarbital. Le CYP2B6, décrit chez l'humain, est impliqué dans le métabolisme hépatique de la cyclophosphamide. On connaît des inhibiteurs de ces enzymes dont le choramphénicol, l'orphénadrine et le sécobarbital (Guengerich FP, 1995).

La sous-famille du CYP2C

Chez tous les mammifères, la sous-famille du CYP2C est de loin la plus nombreuse: à ce jour, elle ne compte pas moins de 28 enzymes distinctes, dont 4 chez l'humain, selon des variations interindividuelles de leurs niveaux d'expression. On

dénombrer 8 de ces enzymes chez le rat et 10 chez le lapin. Notons que l'expression des gènes du CYP2C augmente après exposition au phénobarbital et à la rifampicine. Cette sous-famille métabolise de nombreux composés et médicaments couramment employés. Par exemple, le CYP2C9 présente le plus haut taux d'activité de 7-hydroxylation de la (S)-warfarine, un puissant anti-coagulant. Cette enzyme est également importante dans la biotransformation du tolbutamine. Dans le cas de la phénytoïne, une déficience génétique dans l'expression du CYP2C9 conduit à une faible clairance du médicament. Il apparaît également y avoir une grande variation interindividuelle dans l'expression du CYP2C8, responsable du métabolisme des benzopyrènes et des substrats endogènes tels l'acide arachidonique, les rétinoïdes et les stéroïdes, soulignant la différence de métabolisme entre individus. (Guengerich FP, 1995)

La sous-famille du CYP2D

Cinq gènes différents codent pour les isoformes du CYP2D chez le rat et 3 chez l'humain, constitutivement exprimés dans le foie et à un plus faible niveau dans le rein et l'intestin. Durant la dernière décennie, cette sous-famille a suscité un vif intérêt de par le rôle du CYP2D6 dans le métabolisme de la débrisoquine. L'expression de cette isoforme présente en effet une distribution polymorphique dans la population, dont le phénotype détermine la capacité à métaboliser la débrisoquine; certains sujets peuvent présenter une déficience sévère. Ces enzymes oxydent, en outre, des stéroïdes endogènes et plusieurs médicaments dont les agents anti-arythmiques, les bloqueurs des récepteurs β -adrénergiques, les inhibiteurs de la monoamine oxydase et les dérivés de la morphine (Guengerich FP, 1995).

La sous-famille du CYP2E

La comparaison des structures primaires du CYP2E1 chez différentes espèces montre un haut degré d'identité de séquence. Exprimé de façon constitutive dans le foie et d'autres tissus, sa distribution cellulaire spécifique lui confère une fonction précise. Ainsi, le CYP2E1 est induit par une série de composés chimiques, mais constitue la seule isoforme fortement induite par l'éthanol, via un mécanisme post-translationnel qui implique la stabilisation du complexe enzyme-substrat. Il métabolise de ce fait plusieurs substrats, particulièrement les petits composés hydrophobes comme l'éthanol, des carcinogènes et des produits de la peroxydation des lipides. Il possède la capacité unique de réduire l'O₂ en radicaux oxy-réactifs, pouvant initier la peroxydation des lipides qui génère des produits tel que l'éthanal. Cette isoforme présente de plus un intérêt particulier de par son rôle dans les maladies hépatiques causées par l'alcool (Ronis MJJ et coll., 1996).

1.5.3 La famille du CYP3

Cette famille joue un rôle prédominant dans le métabolisme des xénobiotiques. On compte 13 différents gènes du CYP3A isolés chez plusieurs espèces dont l'humain, le rat, le lapin et la souris. Chez l'humain, le CYP3A4 constitue la forme majeure du P450 exprimé dans le foie. On le retrouve également dans d'autres tissus dont l'intestin et le rein. Cette isoforme est l'homologue du CYP3A1 chez le rat et du CYP3A6 chez le lapin. La régulation de l'expression de ces enzymes est fonction du stade de développement et du sexe; de plus, il a été démontré qu'elle est sous contrôle hormonal, principalement de l'hormone de croissance. Le CYP3A4 représente l'enzyme du P450 la plus importante pour le métabolisme des médicaments: près de la moitié est métabolisé par cette isoforme. Entre autres, elle catalyse la biotransformation de la nifédipine, de la

cyclosporine et de l'érythromycine, et joue également un rôle important dans la 6 β -hydroxylation de stéroïdes comme la testostérone. Son implication dans le métabolisme des xénobiotiques lui confère de ce fait un impact majeur dans les interactions médicamenteuses, lesquelles se voient fortement influencées par l'induction et l'inhibition de cette enzyme. La rifampicine et la dexaméthasone sont des inducteurs souvent utilisés dans l'étude de son mécanisme de régulation (Maurel P, 1996).

En plus du CYP3A4, deux autres isoformes ont été isolées chez l'homme, les CYP3A5 et 3A7, tandis qu'on en retrouve cinq différentes chez le rat ; seulement le CYP3A6 existe chez le lapin (Maurel P, 1996). Chez l'humain, le CYP3A4 a un P.M. de 57,30 kDa, et le CYP3A6 chez le lapin de 57,45 kDa. Le temps de renouvellement de la forme induite de la protéine du CYP3A6 est de 30 heures, alors que la demi-vie de son ARNm est de 22 heures (Correia MA, 1991). Les gènes se situent sur les chromosomes 7 et 6 chez l'humain et le lapin, respectivement, dans la région q ter. Notons qu'il existe deux formes d'ARNm de l'isoforme CYP3A6, soit de 1850 et 1700 pb, dont les tailles diffèrent de par la longueur des séquences dans la région 3'non-traduite (Maurel P, 1996).

1.5.4 La famille du CYP4

La famille du CYP4 est constituée de quatre sous-familles, mais seul le CYP4A, qui comprend 14 membres, a fait l'objet d'études détaillées. Le CYP4A est constitutivement exprimé dans le foie et participe au métabolisme de plusieurs substrats endogènes dont les acides gras et les prostaglandines; son activité est mesurée par le taux de ω -hydroxylation de l'acide laurique. L'induction par le clofibrate et les proliférateurs du peroxysome, via un récepteur spécifique – le PPAR ("peroxysome-proliferator-

activated receptor") – est considérée importante vu leur implication dans l'augmentation de l'incidence des tumeurs au foie (Lake BG et Lewis DFV, 1996).

1.6 La théophylline et ses usages

Dans nos travaux, nous avons utilisé la théophylline comme marqueur de la capacité de biotransformation du P450 hépatique: tel que détaillé au chapitre 4, son métabolisme se voit réduit lors d'une réaction inflammatoire.

Douée d'un puissant effet bronchodilatateur, la théophylline est utilisée pour le contrôle des maladies pulmonaires chroniques obstructives. Elle s'avère efficace également dans le traitement de l'asthme aigu et chronique, et en tant que complément dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et de l'œdème pulmonaire aigu. Cependant, son usage le plus courant demeure la prophylaxie pour le contrôle des symptômes de l'asthme chronique. On lui attribue de surcroît une variété d'effets pharmacologiques incluant ses actions inotropes et chronotropes positives sur le coeur, la stimulation du système nerveux central, la relaxation du muscle lisse, l'augmentation de la diurèse, l'inhibition de la libération de médiateurs, la hausse de la clairance mucociliaire et l'augmentation de la contractilité du muscle diaphragmatique (Ohnishi A, 2000).

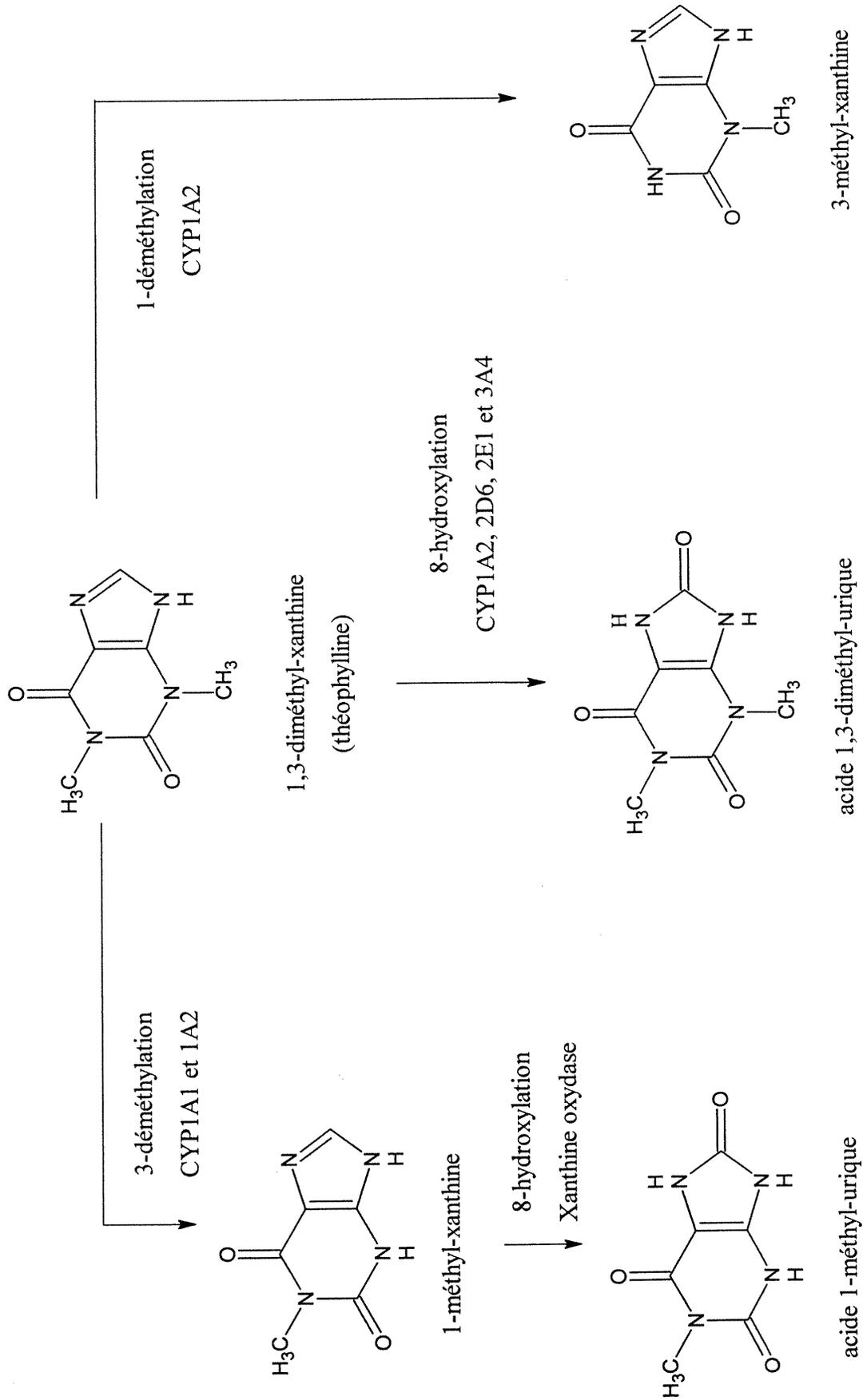
C'est en 1927 qu'on a reconnu sa capacité à faciliter la respiration, et son emploi dans le traitement de la bronchoconstriction a débuté en 1937 (Silverman R, 2000). En Amérique du Nord, la théophylline est encore largement utilisée, et ce malgré son faible index thérapeutique et ses effets indésirables fréquemment rapportés. Chez l'adulte, environ 10% des patients prenant de la théophylline présentent des effets secondaires liés aux concentrations plasmatiques (Dawson AH et Whyte IM, 2000). Les effets indésirables mineurs comprennent de la nervosité, des maux de têtes et des troubles de

sommeil. À cause de son faible index thérapeutique et de la grande variabilité inter-individuelle de sa clairance métabolique, un surdosage peut causer une intoxication grave. La nature et l'intensité des symptômes d'intoxication aiguë dépendent du taux de théophyllinémie, allant de céphalées, nausées et vomissements, à la tachycardie pouvant aller à l'arythmie, et finalement crises convulsives et commotion (Barnes PJ, 1997). La réduction de la clairance de la théophylline peut-être associée à l'état grippal ou à la vaccination anti-grippe et entraîner l'apparition des effets indésirables (Chang KC et coll., 1978). Les bénéfices et les risques associés à la théophylline sont directement reliés aux concentrations sériques, et donc fonction de la dose administrée et du taux d'élimination du médicament chez le patient (Ohnishi A, 2000).

La théophylline est principalement métabolisée dans le foie par le système de monoxygénases grâce à des réactions d'oxydation et de déméthylation: jusqu'à 85 à 90 % de la dose administrée est biotransformée en méthyl-3 xanthine, en acide méthyl-1 urique et en acide diméthyl-1,3 urique, tandis que 10 % du médicament est éliminé sous forme inchangée, par excrétion rénale (Hendeles L et Weinberger M, 1983). Les réactions de biotransformation de la théophylline en ses trois métabolites, effectuées par différentes isoformes du P450, sont présentées à la figure 1.3 (Sarkar MA et Jackson BJ, 1994; Ha HR et coll., 1995; Zhang ZY et Kaminsky LS, 1999).

Figure 1.3

Métabolisme de la théophylline par les enzymes du cytochrome P450



CHAPITRE 2

**LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION
ET DE L'ACTIVITÉ DES ISOFORMES
DU CYTOCHROME P450.**

2. LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITÉ DES ISOFORMES DU CYTOCHROME P450.

2.1 Aspects généraux

La régulation de l'expression et de l'activité du système P450 chez les mammifères s'opère à différents niveaux d'intégration. Celui de l'organisme dans son entier est certes le plus complexe. On considère ici la mise en jeu des mécanismes régulateurs qui sont fonctions de l'âge, du sexe, du stade de développement et de la génétique, sans oublier la différenciation des organes et tissus ainsi que les interactions avec l'environnement. C'est au niveau cellulaire que s'intègrent les mécanismes d'induction, de répression, de contrôle de la traduction et des modifications post-traductionnelles des enzymes du P450. On doit également prendre en compte les propriétés membranaires dont l'influence sur le P450 dépend de la composition lipidique et des interactions protéines-lipides. Par ailleurs, au niveau moléculaire, le contrôle de l'activité tient à la structure de ces enzymes et à la participation de cofacteurs dans la catalyse des réactions. Globalement, tous ces mécanismes de régulation reposent à la base sur des facteurs génétiques et épigénétiques qui influencent de manière importante l'expression et l'activité des enzymes du P450, et déterminent donc la capacité intrinsèque d'un individu à effectuer une réaction de catabolisme donnée (Bernhardt R, 1996).

2.1.1 Les facteurs reliés à l'organisme

L'âge

Un exemple illustrant bien l'effet de l'âge sur le P450 concerne la sensibilité accrue à l'action pharmacologique et à la toxicité des médicaments chez les personnes âgées comparativement aux personnes des autres groupes d'âge. Bien que ceci puisse, dans une certaine mesure, résulter de changements de l'absorption, de la distribution et de l'excrétion des xénobiotiques, on attribue un rôle prépondérant au métabolisme. En effet, les enzymes du P450 présentent un profil d'expression distinct selon la période de développement. Le CYP1A1 est absent dans l'embryon, en abondance faible à la naissance et atteint un niveau maximum entre 2 à 3 mois pour ensuite diminuer avec les années. Les CYP1A2 et 3A6, quant à eux, montrent un profil temporel similaire: une absence chez le fœtus, une augmentation de l'abondance à 1 mois et un maximum à l'âge adulte (Sukhodub AL, 2001). Notons que l'activité enzymatique ainsi que la disponibilité en cofacteurs essentiels peuvent également influencer le métabolisme. Par exemple, les nouveaux-nés montrent une déficience en glucuronosyl transférase, ce qui entraîne une concentration sérique excessive de chloramphénicol non conjugué et l'apparition du "*gray baby syndrome*" (Riddick DS, 1998).

Le sexe et les facteurs hormonaux

La variation du métabolisme selon le sexe est bien documentée chez le rat : les jeunes mâles adultes métabolisent les médicaments plus rapidement que les femelles. Cette différence a été clairement associée aux androgènes et à l'expression sexe-spécifique de certaines isoformes du P450. Une différence dépendante du sexe existe également chez l'humain quant au métabolisme de l'éthanol, du propranolol, des

benzodiazépines, des oestrogènes et des salicylates. Alors que les stéroïdes sexuels contribuent de manière directe à la différence observée entre les deux sexes, le déterminant hormonal majeur serait le profil sexe-dépendant de la sécrétion de l'hormone de croissance par l'hypophyse. Ainsi, plusieurs enzymes du cytochrome P450 sont sous contrôle stricte de facteurs endocriniens (Shapiro BH et coll., 1995 ; Mugford CA et Kedderis GL, 1998).

La diète

Plusieurs macro- et micro-nutriments affectent la biotransformation des médicaments. Il s'avère cependant difficile de dégager une généralisation quant aux effets de la diète, car chaque enzyme du système P450 montre une sensibilité particulière. Néanmoins, on reconnaît que les diètes faibles en protéines ou déficitaires en acides gras essentiels diminuent les biotransformations catalysées par le P450. Plusieurs vitamines et minéraux peuvent également influencer cette capacité métabolique. Il est intéressant de noter que les indoles, retrouvés dans certains légumes tels le brocoli et le chou-fleur, ont une certaine capacité de prévenir la carcinogenèse en causant une forte augmentation de l'activité d'isoformes du P450 et de la conjugaison. À l'inverse, le jus de pamplemousse exerce un effet inhibiteur sur le CYP3A4 et augmente de ce fait la biodisponibilité, entre autres, du midazolam (Walter-Sack I et Klotz U, 1996).

Les facteurs génétiques

Le polymorphisme génétique du P450 influence la capacité à biotransformer plusieurs médicaments. Ainsi, la pharmacogénétique a permis d'établir qu'environ 10% de la population caucasioïde est déficiente en CYP2D6, résultat de mutations dans le gène impliqué. Ce phénotype est responsable des concentrations plus élevées des agents

thérapeutiques dont le métabolisme dépend de cette isoforme avec possibilité d'une efficacité accrue et d'une toxicité plus élevée (van der Weide J et Steijns LS, 1999). Depuis tout récemment, l'utilisation de micropuces à ADN a permis de déterminer de façon discriminative le profil d'expression (ARNm) de multiples isoformes du P450 impliquées dans le métabolisme des médicaments et la toxicologie. Ce nouvel outil peut donc faciliter la prédiction du phénotype chez un patient quant au type de métabolisateur – rapide ou lent – pour un médicament donné (Gerhold DD et coll., 2001).

La spécificité tissulaire

Un mécanisme de régulation encore obscur permet l'expression de certaines enzymes du P450 de manière strictement spécifique à un tissu donné. L'exemple le mieux décrit concerne l'activité stéroïde hydroxylase régulée par l'ACTH, qui emprunte une voie AMPc-dépendante. Alors que le CYP11A1, le catalyseur de l'étape initiale de la conversion du cholestérol en stéroïdes (ici la prégnénolone) est exprimé dans tous les tissus stéroïdogéniques, l'expression des CYP11B1, 11B2 et 2A1 se limite uniquement à la surrénale, en parfaite concordance avec la nature des produits formés (Kapitulnik J et Strobel HW, 1999). En principe, l'analyse de la région régulatrice d'amont (5' non-transcrite) d'un gène devrait révéler des séquences *cis* avec lesquelles des facteurs *trans* interagissent pour assurer la spécificité tissulaire ; toutefois les séquences précises n'ont pas encore été définies (Morley SD et coll., 1996).

2.1.2 La régulation au niveau cellulaire

Les mécanismes assurant la régulation cellulaire du cytochrome P450 sont aussi nombreux que complexes, ils peuvent agir au niveau de l'induction enzymatique, de la régulation négative de l'expression génique et des modifications post-traductionnelles qui

peuvent aboutir à l'inhibition de l'enzyme. Les micropuces à ADN devraient s'avérer très utiles puisqu'elles permettront de cibler les gènes impliqués dans le métabolisme qui sont induits ou réprimés suite à un traitement donné. Elles pourront également déterminer les gènes impliqués dans les mécanismes d'action responsables des effets observés (Gerhold DD et coll., 2001).

Bien que plusieurs isoformes du P450 soient détectables dans le foie d'animaux en conditions normales, le profil d'expression de ces enzymes change de manière dramatique et différentielle après exposition à des inducteurs. La découverte du phénomène d'induction enzymatique remonte à 1945, bien avant la découverte du P450 lui-même: l'équipe de EC Miller a observé une induction du métabolisme de xénobiotiques causée par des carcinogènes tels les hydrocarbures aromatiques (Miller EC et coll., 1952). Bien plus tard, en 1979, le mécanisme d'induction fut élucidé: il s'agit d'une augmentation du taux de synthèse de l'ARNm pour chaque isoforme du P450 (Du Bois RN et Waterman MR, 1979). Plusieurs laboratoires ont confirmé l'induction des enzymes du P450, par exemple en traitant des rats et des lapins au 3-méthylcholanthrène ou à la β -naphthoflavone (Waterman MR et Estabrook RW, 1983).

L'induction de la transcription du CYP1A1 par l'activateur du récepteur Ah figure parmi les modèles les mieux connus. Dans ce cas, l'inducteur (le 3-méthylcholanthrène ou le TCDD) se lie au récepteur Ah cytosolique, lui-même lié à la protéine HSP ("heat shock protein"). Cette liaison entraîne la dissociation de la protéine HSP et permet la translocation au noyau du complexe ligand-récepteur. Une fois dans le noyau, le complexe forme un hétérodimère avec la sous-unité Arnt pour générer un facteur de transcription capable de lier l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) situé dans la région régulatrice d'amont du gène.

Cette liaison active la transcription de l'ARNm de l'isoforme et il en résulte une augmentation de la traduction en protéine. L'induction des gènes de la sous-famille des CYP3A, 2B et 4A par divers agents chimiques s'effectue également via l'activation de facteurs de transcription, qui comprennent des récepteurs nucléaires; ce phénomène sera décrit dans la section suivante. Pour sa part, le mécanisme d'induction par l'éthanol demeure mal compris, il s'agirait ici d'une stabilisation de la protéine. L'induction du CYP1A2 par le 3-méthylcholanthrène, quant à elle, impliquerait une stabilisation de son ARNm (Delescluse C et coll., 2000; Morgan ET, 2001).

L'induction est un phénomène répandu et d'impact majeur sur le métabolisme de composés endogènes et exogènes tels que les médicaments, les pesticides, les additifs alimentaires et produits chimiques de tous ordres. Plusieurs enzymes de la phase I sont susceptibles d'induction (les CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B1, 2B2, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1 et 3A4). Les enzymes de phase II comme la glucuronosyl transférase, la glutathion-S-transférase, l'époxyde hydroxylase et le cytochrome b₅ sont aussi inductibles, et peuvent ainsi modifier le métabolisme des xénobiotiques et de substances endogènes. Généralement, les inducteurs stimulent leur propre biotransformation, induisent souvent plus d'un CYP, et sont actifs chez plusieurs espèces et sur plus d'un tissu. L'induction enzymatique peut exercer des effets positifs si les enzymes de phase I sont couplés à de hauts taux d'enzymes de phase II (par exemple pour l'élimination de toxines). En revanche, elle peut aussi causer des effets négatifs tels l'activation de pro-carcinogènes ou la réduction de la demi-vie de substrats (Dogra SC et coll., 1998; Sheweita SA, 2000).

À l'inverse de l'induction, plusieurs facteurs peuvent causer une régulation négative du P450, en diminuant soit la transcription des gènes, la stabilité de leur ARNm, la traduction ou en stimulant la dégradation de certaines isoformes. Ces phénomènes

seront décrits plus loin dans cette thèse, et plus spécifiquement dans le contexte d'une réaction inflammatoire.

Les modifications post-traductionnelles du P450 les plus fréquentes chez les eucaryotes sont la glycosylation et la phosphorylation de protéines. De par sa réversibilité, cette dernière joue un rôle clé dans la régulation post-traductionnelle, et à court terme, des isoformes du cytochrome P450. Plusieurs enzymes du P450 subissent une phosphorylation menant le plus souvent à une diminution de leur activité catalytique, sans changement dans la quantité de protéines; ce sujet sera traité en détail dans la discussion. Les CYP11A1, 11B1 et 2B4 subissent une phosphorylation menant à une dénaturation de l'hémoprotéine plutôt qu'au contrôle à court terme de l'activité. Le CYP2E1 peut subir une phosphorylation AMPc-dépendante dans les hépatocytes avec dénaturation concomitante, perte d'activité et dégradation rapide. Le CYP3A1 peut également être phosphorylé avec dénaturation subséquente, perte de l'hème et de l'activité catalytique (Bernhardt R, 1996; Morgan ET, 1997).

Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation du cytochrome P450

L'expression de gènes jouant un rôle spécifique dans le foie est gouvernée premièrement au niveau transcriptionnel et dépend, entre autres, de l'action combinée de nombreux facteurs de transcription. Ces facteurs comprennent également la superfamille des récepteurs nucléaires, qui traduisent le signal extra ou intracellulaire en une réponse cellulaire déclenchée par la transcription de gènes cibles.

Les facteurs susceptibles de réguler l'expression des isoenzymes du P450 comprennent les facteurs de transcription enrichies dans le foie (LEFT), dont les facteurs nucléaires hépatocytaires-1, 3 et 4 et le C/EBP ("CAAT enhancer-binding protein").

Parmi les LEFT, le facteur nucléaire hépatocytaire-4 (HNF-4) constitue un élément important dans la régulation de plusieurs gènes hépatiques, incluant ceux impliqués dans le métabolisme des acides gras, du cholestérol et du glucose, de la biosynthèse de l'urée, de la synthèse de protéines plasmatiques et de la différenciation du foie. Plusieurs données suggèrent que le HNF-4 soit un facteur important dans l'expression constitutive des CYPs et jouerait donc un rôle positif dans la régulation des CYP2C12 et 3A de rat, CYP2A4 de souris, CYP2C1/2 de lapin, et CYP2C9 et 2D6 humains. De la même manière, dans des hépatocytes humains, il a été montré que le HNF-4 est un régulateur général supportant l'expression de différents CYPs, dont les CYP3A4, 3A5 et 2A5 (Jover R et coll., 1998).

Le C/EBP α , un facteur de régulation dans le foie, augmente en conditions normales l'expression de plusieurs isoformes du P450, dont les CYP2B6, 2C9 et 2D6, dans les cellules HepG2. De faibles concentrations de C/EBP α ont été associées à un faible taux d'expression du P450 (Jover R et coll., 1998). Le C/EBP α est également requis pour l'expression constitutive de l'UDP-glucuronosyl transférase. Ces données suggèrent que ce facteur de transcription serait impliqué dans l'expression de gènes responsables du métabolisme de xénobiotiques et de la conjugaison de la bilirubine (Morgan ET et coll., 1998).

Comme nous l'avons vu précédemment, le AhR, lié au récepteur nucléaire Arnt, est un facteur de transcription qui contrôle l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme, principalement des CYP1A1 et 1A2. D'autres facteurs de transcription activés par des stimuli inflammatoires, tels le NF- κ B et c-Myc (un produit du gène *c-myc*), peuvent réguler l'expression des isoformes du P450: leurs rôles spécifiques seront décrits dans la discussion.

On connaît à ce jour 3 récepteurs orphelins de la famille des récepteurs nucléaires qui participent aux mécanismes d'induction de l'expression des isoenzymes du P450 hépatique par les xénobiotiques: le CAR ("constitutively activated receptor") qui règle l'expression des isoenzymes de la famille du CYP2 en réponse au phénobarbital; le PXR ("pregnane X receptor") qui règle celle du CYP3 en réponse à la rifampicine; et le PPAR- α ("peroxisome proliferator-activated receptor") pour le CYP4 en réponse au clofibrate. Ce dernier agit aussi comme régulateur central du catabolisme des acides gras en situation de jeûne et de stress (Honkakoski P et Negishi M, 2000).

L'action des récepteurs nucléaires est sujette à régulation à plusieurs niveaux: la liaison au ligand ou à l'ADN, la dimérisation et la co-activation. Il peut également exister une compétition entre les co-activateurs ou une interaction avec des co-répresseurs afin de diminuer la transcription de gènes (Honkakoski P et Negishi M, 2000). Par ailleurs, la liaison de facteurs à des sites près du promoteur peut prévenir la formation du complexe d'initiation de la transcription, ce qui conduit à la réduction de l'expression des gènes (Morgan ET, 1997). Les facteurs de transcription peuvent, selon le cas, se lier à des séquences de régulation positive sur le promoteur et augmenter la transcription de gènes cibles, ou se lier à des séquences extinctrices ("silencer") et réduire la transcription. Une interaction entre facteurs de transcription peut également réduire leur liaison à la séquence stimulatrice ("enhancer") spécifique sur le promoteur et ainsi empêcher la transcription (Tian Y et coll., 1999). Ces notions seront reprises dans la discussion.

2.1.3 La régulation au niveau membranaire

Étant liées à des membranes, principalement celles du réticulum endoplasmique, les enzymes du P450 sont également sujettes à une régulation à ce niveau. De concert

avec la NADPH cytochrome P450 réductase, les lipides membranaires jouent un rôle essentiel dans l'activité du P450 : ils induisent et stabilisent une conformation active du P450 et assurent l'interaction avec les systèmes de donneurs d'électrons (Yang CS, 1997).

2.1.4 La régulation au niveau moléculaire

Le fer oxydé dans le cytochrome P450 existe sous deux formes magnétiques stables: de haut ou de bas-spin. Il existe une corrélation entre les caractéristiques spectrales du P450 et l'état de spin du fer dans l'hème, ce qui permet d'étudier la liaison de substrats. À cet effet, notons que la barrière énergétique entre les deux états de spin est faible, de sorte que la liaison d'un substrat modifie l'équilibre, le plus souvent en faveur de la forme haut-spin. Dans certains cas, l'affinité d'un substrat pour l'état haut-spin peut être beaucoup plus grande que pour l'état bas-spin. Ce changement d'état, dû à la liaison du substrat, est souvent couplé à une diminution du potentiel rédox (Lewis DF et Hlavica P, 2000). De ces considérations, il ressort qu'un substrat peut induire la conformation active du P450 en modifiant l'état de spin, et donc contrôler l'activité de l'enzyme. Cette capacité à activer l'enzyme est fonction de la nature du substrat et de l'isoforme du P450. Par l'effet sur le potentiel redox, ceci peut favoriser la réduction du substrat (Bernhardt, 1996). Notons de plus que la constante enzyme/substrat joue un rôle important dans le niveau d'inhibition (de Wildt SN et coll., 1999).

CHAPITRE 3

L'INFLAMMATION

3. L'INFLAMMATION

3.1 Définition

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme, initiée par un dommage tissulaire causé soit par un facteur endogène telle la nécrose, ou exogène tels un agent infectieux, un antigène ou un traumatisme. Elle constitue une part importante de l'immunité innée et acquise. Ce vaste domaine de recherche a fait l'objet de nombreuses revues de littérature (Konstantinos AP et Sheridan JF, 2001; Neuzil KM et Graham BS, 2001; Streetz KL et coll., 2001). Les pages qui suivent tentent de couvrir les principales données reliées au thème de recherche abordé dans cette thèse.

3.2 La réaction inflammatoire locale

L'injection sous-cutanée de térébenthine utilisée dans notre modèle expérimental correspond à un type d'inflammation déclenchée par un stimulus externe qui provoque d'abord une lésion tissulaire locale, soit un granulome. Dans les premières minutes suivant l'injection, le processus inflammatoire débute par la production de substances endogènes qui, entre autres, causent une vasodilatation des capillaires sanguins et un accroissement de la perméabilité capillaire. La réaction inflammatoire modifie profondément l'interaction des leucocytes avec la surface endothéliale: après la stimulation de l'endothélium au site inflammatoire, le nombre de leucocytes qui roulent à la surface endothéliale augmente de façon significative. Cet attachement initial et transitoire fait ensuite place à leur adhésion ferme et enfin à leur migration dans le tissu extravasculaire vers le foyer inflammatoire. Plusieurs facteurs chimiotactiques influencent ce rassemblement de leucocytes, dont le fragment C5a du complément, le leucotriène (LC) B4, le facteur d'agrégation plaquettaire et des produits bactériens tels des peptides,

enzymes et polysaccharides. La majorité des cellules impliquées dans la réponse sont de type phagocytaire : durant les 30 à 60 premières minutes, il y a accumulation principalement de neutrophiles qui phagocytent l'intrus ou le tissu endommagé. Si la cause de l'inflammation persiste, à l'intérieur de 5 à 6 heures, la lésion se voit infiltrée de cellules mononuclées, incluant macrophages et lymphocytes T. Dans les derniers stades de l'inflammation, les macrophages représentent les cellules les plus abondantes au site, entre autres à cause de leur demi-vie plus longue. En plus d'effectuer de la phagocytose, ils contribuent au maintien de la réaction en sécrétant de nombreuses substances, telles des cytokines (IL-1, IL-6, IFN- α , IFN- β , TGF- β et IL-8), les composants 1 à 5 du complément, des substances oxygénées réactives (SOR), des prostaglandines, des LC, le facteur d'agrégation plaquettaire, les facteurs de stimulation pour les colonies de granulocytes et/ou macrophages, les protéines pro-inflammatoires, etc. L'infiltrat de cellules inflammatoires et la formation de tissu conjonctif vascularisé permettent de limiter l'étendue de la lésion, ce qui constitue une réponse inflammatoire locale dite aiguë. Dans ce modèle, l'inflammation atteint son paroxysme 48 heures après l'injection de térébenthine (Ashton FE et coll., 1970; Engler R, 1988; Benjamini E et Leskowitz S, 1991).

Il en résulte généralement des modifications locales caractéristiques de l'inflammation: la rougeur, la douleur, la chaleur et l'œdème, ainsi que des modifications systémiques telle la synthèse de protéines de la phase aiguë (Engler R, 1988). La réaction inflammatoire systémique est sous la dépendance de facteurs humoraux et cellulaires produits au site de lésion tissulaire ainsi que par le système nerveux, des glandes endocrines, le système immunitaire et le foie. L'hyperthermie résulte de l'action centrale des substances pyrogènes endogènes telle l'IL-1. Le foie répond à l'inflammation en

réduisant sa synthèse d'albumine et en augmentant sa synthèse des protéines de la phase aiguë. Ces dernières se divisent en deux groupes : les protéines de Type I, induites par l'IL-1 α/β et le TNF- α/β , et les protéines de Type II induites par l'IL-6. Celles de Type I comprennent la protéine amyloïde sérique A, la protéine C-réactive, le complément C3 et l' α_1 -glycoprotéine acide tandis que les protéines de Type II sont le fibrinogène, l' α_1 -antitrypsine, l' α_1 -antichymotrypsine et l' α_2 -macroglobuline. Dans certains cas il peut s'avérer difficile, voire impossible, d'éliminer la cause de l'inflammation, menant ainsi à l'inflammation chronique. (Benjamini E et Leskowitz S, 1991; Otten U et coll., 2000; Streetz KL et coll., 2001).

3.3 L'infection virale

Les virus constituent la source majeure de maladies respiratoires aiguës chez l'humain. Une grande variété de virus se répliquent dans les cellules épithéliales tapissant les voies respiratoires, dont le virus de l'influenza responsable d'un taux de morbidité et mortalité significatif. Les macrophages alvéolaires jouent un rôle important dans la réaction inflammatoire, soit par la présentation d'antigènes, la sécrétion de cytokines ou l'activité antivirale directe. Il convient de souligner l'intérêt croissant suscité par le rôle des cytokines comme médiateurs de la réponse de l'hôte lors d'une infection virale. Le virus de l'influenza peut infecter les monocytes humains et augmenter l'expression de cytokines pro-inflammatoires, principalement le TNF- α . Dans cet état pathologique, l'IFN- γ est induit à un haut niveau (Neuzil KM, 2000; Konstantinos AP et Sheridan JF, 2001). L'infection virale servira de modèle dans cette thèse afin de déterminer les répercussions de ce type d'inflammation sur le P450.

3.4 Les médiateurs de l'inflammation

Le déroulement de la réaction inflammatoire fait appel à des médiateurs sériques, par exemple les cytokines, les protéines du complément et les dérivés de l'acide arachidonique, pour orchestrer la défense de l'hôte. Les médiateurs de l'inflammation sont sécrétés par des types cellulaires particuliers, dont les macrophages et les cellules leucocytaires, et peuvent exercer à la fois des effets pleiotropiques, c'est-à-dire physiologiques sur de multiples cibles, et des effets redondants dans leurs activités et fonctions. Leurs interactions, souvent complexes, donnent lieu à une synergie ou à un effet antagoniste (Streetz KL et coll., 2001).

3.4.1 Le système du complément

Le système du complément consiste en un groupe de protéines sériques qui s'activent en cascade pour générer des molécules biologiquement actives telles des enzymes, les opsonines, les anaphylatoxines et des substances chimiotactiques. L'activation du complément peut être initiée par des complexes antigène-anticorps (voie classique), par des constituants de la paroi cellulaire de pathogènes tels les lipopolysaccharides (LPS) (voie alterne) et par des oligosaccharides (voies des leptines). L'activation du système du complément culmine en une lyse cellulaire. Une étape importante lors de l'inflammation est la sécrétion des compléments 3 et 5 (C3 et C5) par les macrophages qui participent à la cascade du complément pour provoquer les nombreux effets biologiques: 1- les C3a et C5a qui induisent la dégranulation des mastocytes et/ou basophiles avec relâche d'histamine pour augmenter la perméabilité capillaire et la contraction des muscles lisses, d'où leur effet anaphylactique; 2- production d'un effet chimiotactique sur les cellules phagocytaires pour leur migration au

foyer inflammatoire (C5a); et 3- opsonisation pour l'adhérence immune, c'est-à-dire l'adhérence aux phagocytes qui présentent des récepteurs à C3b, ce qui facilite l'endocytose (Streetz KL et coll., 2001).

3.4.2 Les cytokines

Les cytokines sont des protéines hormonales produites par une grande variété de types cellulaires durant la réponse immune. Généralement, la production de cytokines est brève et régulée au niveau transcriptionnel. Leurs principaux effets se manifestent sur les cellules avoisinantes, mais lorsque libérées dans la circulation elles peuvent entraîner un effet systémique, notamment au foie. L'excès de production, par exemple lors du choc septique, entraîne des effets délétères associés à l'inflammation. Les cytokines ont des sources et des fonctions redondantes, cette notion est brièvement résumée dans le tableau 3.1. De façon générale, elles influencent la sécrétion et l'activité d'autres cytokines par un mécanisme de synergie ou via un effet inhibiteur. Elles peuvent également exercer un effet antiviral direct ou via leur influence sur la réponse immune subséquente (Otten U et coll., 2000; Neuzil KM et Graham BS, 2001).

A la suite d'un dommage tissulaire, la réponse inflammatoire locale est initiée par la relâche de $\text{TNF-}\alpha$ et d' $\text{IL-1}\beta$ par les mastocytes et macrophages (Watkins LR et coll., 1995). Ces deux cytokines agissent ensuite sur les cellules endothéliales et les fibroblastes pour stimuler la relâche d' IL-1 et d' IL-6 et d'autres cytokines telle l' IL-8 (Lowry SF, 1993).

Tableau 3.1

**Sources cellulaires et action des différentes cytokines
produites lors d'une réaction inflammatoire**

Cytokines	Sources cellulaires potentielles	Mécanismes d'action potentiels
Interleukine-1 β (IL-1 β)	Cellules épithéliales, monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules NK, lymphocytes B et T.	Promouvoit la différenciation des lymphocytes B et T; active les cellules NK, induit l'expression des molécules d'adhésion.
Interleukine-6 (IL-6)	Lymphocytes T, monocytes, macrophages, fibroblastes, cellules épithéliales et endothéliales, hépatocytes.	Induit l'activation et la prolifération des cellules T, la différenciation des cellules B et T cytotoxiques, la réponse à l'IgA.
Interféron- γ (IFN- γ)	Cellules NK, lymphocytes T.	Active les macrophages, stimule l'activité antivirale; augmente l'expression des CMH I et II et la synthèse d'oxyde nitrique.
Facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α)	Macrophages, monocytes, lymphocytes B et T, cellules NK, neutrophiles, cellules épithéliales et endothéliales.	Activité antivirale; augmente la production de prostaglandines et de superoxyde; stimule l'activité des neutrophiles et la phagocytose.

3.4.3 Cytokines antivirales

Chez l'humain, les cellules épithéliales des voies respiratoires participent à la défense de l'hôte en fournissant une barrière physique et un manteau de cils qui expulsent les particules étrangères. De plus, elles contribuent à la génération de la réponse immunitaire en produisant, entre autres, des cytokines. Les cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-11, le GM-CSF et le TNF- α peuvent initier ou moduler la réponse dans les voies aériennes (Konstantinos AP et Sheridan JF, 2001).

La production de cytokines antivirales dans les voies respiratoires représente une défense non spécifique qui limite la réplication virale dans l'attente que se développent les mécanismes de défense dirigés spécifiquement contre le virus. Ainsi, les interférons font partie du système immunitaire inné qui protège contre les infections virales: par exemple, l'IFN- γ inhibe leur réplication (Konstantinos AP et Sheridan JF, 2001).

3.4.4 Les substances oxygénées réactives (SOR)

Les SOR et leurs sources

La production de SOR par les cellules stimulées par les cytokines contribue à la défense de l'organisme (action microbicide); cependant, elles peuvent entraîner des effets toxiques tels la peroxydation des lipides membranaires et des dommages aux composantes protéiques et à l'ADN. Les principales SOR reconnues pour affecter l'expression et l'activité du cytochrome P450 hépatique durant l'inflammation sont le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxyde nitrique (NO \cdot), le radical hydroxyle (OH \cdot) et l'anion superoxyde (\cdot O₂⁻) (McCord JM, 2000).

Quantitativement, trois systèmes enzymatiques majeurs produisent des SOR. La NADPH oxydase, localisée dans la membrane plasmique des macrophages et des neutrophiles catalyse la formation de $\cdot\text{O}_2^-$ à partir de l'oxygène. La chaîne respiratoire mitochondriale est également une source majeure de $\cdot\text{O}_2^-$ via le complexe ubiquinone-cytochrome b-cytochrome c1, qui peuvent ensuite mener à la production de H_2O_2 et de $\text{OH}\cdot$. Quant à la xanthine oxydase qui catalyse la transformation de la xanthine en acide urique, elle contribue de ce fait à la production de $\cdot\text{O}_2^-$ et H_2O_2 . (Evans P et Halliwell B, 1999; McCord JM, 2000).

Les antioxydants

Une part importante de la défense cellulaire contre le stress oxydatif est l'induction spécifique de l'expression de gènes codant, entre autres, pour des antioxydants de nature enzymatique, qui contribuent à prévenir l'oxydation de substrats par la réduction des SOR. La superoxyde dismutase piège le $\cdot\text{O}_2^-$ et catalyse sa dismutation en H_2O_2 , lequel traverse facilement les membranes; le diéthylthiocarbamate est un inhibiteur de cette enzyme. La catalase élimine le H_2O_2 ; elle peut être inhibée par le 3-amino-1,2,4-triazole. La glutathion peroxydase décompose le H_2O_2 en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme co-facteur. De nombreuses substances anti-oxydantes capables de contrecarrer les SOR sont également utilisées en laboratoire. La N-acétylcystéine, un précurseur du GSH, peut contribuer à réduire la quantité de H_2O_2 ; la glutathion transférase est par contre inhibée par le DL-buthionine-(SR)-sulphoxamine. Quant au radical $\text{OH}\cdot$, hautement réactif et toxique, on utilise la diméthylthiourée (DMTU) comme piègeur efficace. La vitamine E (α -tocophérol) et la vitamine C (acide ascorbique) sont des antioxydants naturels. (Halliwell B et coll., 1995)

Le rôle des SOR dans la baisse du P450 durant l'inflammation

Il a été montré que *in vivo*, la diminution du contenu total en cytochrome P450 hépatique induite par une réaction inflammatoire aiguë s'accompagne d'une augmentation de la peroxydation des lipides (Parent C et coll., 1992; Proulx M et du Souich P, 1995a; Proulx M et du Souich P, 1995b). Le rôle des SOR dans la répression et la diminution de l'activité du P450 est de plus en plus documenté et sera couvert de façon détaillée dans la discussion.

Le monoxyde d'azote (oxyde nitrique, NO)

Le NO est un messager cellulaire à courte demi-vie qui joue des rôles importants dans les systèmes nerveux et cardiovasculaire. De plus, il peut s'opposer au développement de microorganismes, réduire la thrombose (anti-agrégant) et améliorer l'apport sanguin (puissant vasodilatateur) dans les tissus endommagés. Cependant, lorsque produit en excès, il peut causer des dommages tissulaires et contribuer au développement de maladies incluant le choc septique, l'arthrite rhumatoïde, l'ischémie cérébrale, la sclérose et le diabète (Galea E et Feinstein DL, 1999).

Dans plusieurs travaux, on utilise le nitroprussiate de sodium (NPS) comme source de NO; *in vivo*, le NO est biosynthétisé à partir de la L-arginine et de l'oxygène par les NO synthases (NOS). Il peut former un complexe fer-nitrosyle dans une hémoprotéine et modifier l'activité d'enzymes-clé du métabolisme telles l'aconitase-c (IRP-1), la cyclooxygénase et la glutathion réductase. La liaison au fer hémique dans la guanylyle cyclase soluble active l'enzyme et stimule la formation de GMPc, expliquant l'effet vasodilatateur du NO. Une inhibition irréversible peut également se produire par nitration de résidus tyrosines ou par l'oxydation de groupements sulfhydryles. De plus, le NO réagit avec l'anion superoxyde pour former l'anion très réactif peroxy-nitrite (ONOO⁻)

puis du nitrosyle (ONOOH) qui se décompose en radical hydroxyle toxique. Par ailleurs, notons que la NOS inductible (NOS_i ou NOS₂) est exprimée principalement dans les macrophages (incluant les cellules de Kupffer) et dans les hépatocytes suite aux stimuli inflammatoires (Bredt DS et Snyder SH, 1994; Laroux FS et coll., 2000). La génération de NO dans les macrophages en réponse aux cytokines peut stimuler l'activité de la cyclooxygénase, indiquant que le NO des macrophages agit dans la propagation de la réponse inflammatoire systémique (Laroux FS et coll., 2000). Dans le foie, la NOS_i est induite par une combinaison spécifique de cytokines et de LPS (Decker K, 1998); sa régulation diffère de celle des protéines de la phase aiguë puisque l'induction de la NOS_i par l'IL-1 et le TNF- α se voit inhibée par les glucocorticoïdes et stimulée par l'IFN- γ . L'injection de térébenthine, quant à elle, conditionne les hépatocytes à l'induction de la NOS_i (Freeswick PD et coll., 1994). L'induction de la NOS, ou l'exposition au NO diminue la synthèse des protéines hépatiques et inhibe des protéines mitochondriales (Taylor BS et coll., 1998). L'ester méthylique de la N-nitro-L-arginine (N-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) est un inhibiteur de la NOS et peut donc diminuer la production de NO.

CHAPITRE 4

L'EFFET DE L'INFLAMMATION SUR LE MÉTABOLISME DES MÉDICAMENTS ET LE CYTOCHROME P450

4. L'EFFET DE L'INFLAMMATION SUR LE MÉTABOLISME DES MÉDICAMENTS ET LE CYTOCHROME P450

Une longue série de résultats convergents attestent que les maladies infectieuses et l'inflammation peuvent causer une diminution de la clairance des xénobiotiques, conséquence des changements de l'activité et du niveau d'expression de différentes isoformes du P450 dans le foie, l'intestin, le rein et le cerveau. Alors que la perte d'activité pharmacologique de médicaments importants dépend de leur métabolisme hépatique, d'autres, à l'inverse, doivent y être convertis en leurs métabolites actifs. Les facteurs qui modulent l'expression et l'activité du P450 peuvent donc entraîner des effets secondaires néfastes, principalement dans le cas des médicaments à faible indice thérapeutique. La question se pose alors de savoir comment l'inflammation et les maladies infectieuses produisent ces effets.

4.1 Pertinence clinique

Les maladies infectieuses virales et bactériennes affectent annuellement des millions de personnes dans le monde (Madoff LC et Kasper DL, 1994). L'incidence des maladies respiratoires virales aiguës en Amérique du Nord est de 3 à 5,6 cas par personne par année (Dolin R, 1994). Les infections urinaires bactériennes comptent pour plus de six millions de visites en clinique, contribuant aux 300 000 à 500 000 cas de septicémie par année (Stamm WE, 1994).

Qu'en est-il de l'impact de ces maladies sur le métabolisme, l'action et les effets secondaires des médicaments? Les observations cliniques révèlent un impact majeur. Par

exemple, les réactions inflammatoires aiguës déclenchées par l'infection respiratoire virale, une pneumonie bactérienne et la vaccination au BCG diminuent la clairance de la théophylline et de l'antipyrine (Chang KC et coll., 1978; Sonne J et coll., 1985). Les personnes âgées – particulièrement sujettes aux infections virales et bactériennes – consomment en moyenne cinq médicaments différents par jour, et en conséquence les effets secondaires sont beaucoup plus fréquents (Lowenstein SR et Schier RW, 1982). Rappelons que les réactions adverses induites par les médicaments demeurent encore aujourd'hui responsables de 5 à 10 % de toutes les hospitalisations, et contribuent à en prolonger la durée (Lechat P et coll., 1988).

L'implication des médiateurs de l'inflammation ne se limite pas à l'infection ni aux maladies inflammatoires: les interférons sont utilisés dans le traitement de l'hépatite B, dans une variété de cancers et d'infections virales, et d'autres cytokines sont actuellement sous investigation dans le traitement du cancer.

4.2 Études chez l'humain

Une des premières études expérimentales montrant l'effet de l'infection sur le métabolisme des médicaments fut conduite en 1976 chez des patients atteints de la malaria à *Plasmodium falciparum*: ils présentaient tous une augmentation de la concentration plasmatique de quinine et du ratio de la quinine sur ses métabolites (Trenholme GM et coll., 1976).

En 1978, Chang et coll. ont documenté une augmentation de la demi-vie de la théophylline durant l'influenza et l'infection adénovirale chez des enfants asthmatiques. Quelques années plus tard, un groupe de recherche a démontré que l'influenza B cause une toxicité modérée à sévère à la théophylline chez des enfants asthmatiques traités avec

ce médicament (Kraemer MJ et coll., 1982). De nombreuses études ont montré une réduction de la clairance de composés tels l'aminopyrine et la théophylline suite à la vaccination contre l'influenza (Levy M, 1997).

Les infections bactériennes perturbent également la clairance des xénobiotiques chez l'humain. Ainsi, des sujets atteints de pneumonie bactérienne d'étiologies diverses (*Hemophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae* et *Legionella pneumonia*) ont montré une diminution de la clairance de l'antipyrine (Sonne J et coll., 1985). Chez des volontaires, l'injection de lipopolysaccharides d'origine bactérienne réduit également la clairance de l'antipyrine, de l'hexobarbital et de la théophylline (Shedlofsky SI et coll., 1994). Également, chez deux patients présentant un choc septique, la clairance du midazolam était réduite (Shelly MP et coll., 1987).

Chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique, une maladie autoimmune idiopathique, on observe une incidence accrue de métaboliseurs lents pour la débrisoquine, causée par une réduction de l'activité du CYP2D6 (Baer AN et coll., 1986).

Il est maintenant reconnu que plusieurs cytokines et autres médiateurs de l'inflammation sont impliqués dans la réponse du cytochrome P450 durant l'inflammation. L'interféron suscite un intérêt particulier puisqu'il est utilisé dans le traitement de maladies virales telle l'hépatite C. En 1987, Williams et Farrell ont montré pour la première fois que l'administration d'IFN entraîne une diminution de la clairance de la théophylline (Williams SJ et coll., 1987). Plusieurs études ont confirmé ces observations sur la base d'une réduction du métabolisme de l'antipyrine, de l'érythromycine et de la théophylline (Williams SJ et Farrell GC, 1989; Craig PI et coll., 1993; Okuno H et coll., 1993).

4.3 Études chez l'animal

Le premier indice d'une interaction entre le système immunitaire et le métabolisme hépatique chez l'animal fut rapporté en 1953: des rats injectés au bleu de trypan – un dépresseur du système réticulo-endothélial (SRE) – montraient des temps de sommeil induit au phénobarbital prolongés (Samaras SC et Dietz N Jr, 1953). Depuis, de nombreux travaux ont démontré que les stimulants du système immunitaire sont capables de réduire le cytochrome P450 hépatique : 1) l'injection intra-péritonéale de cérite, particules irritantes qui stimulent les macrophages péritonéaux, diminue la N-déméthylation de la diméthylaniline par les microsomes de rats; 2) des adjuvants telles ceux de mycobactéries diminuent le contenu microsomal en P450 dans des modèles d'arthrite, ce qui expliquerait la perte d'effet du cyclophosphamide dans cette maladie par une réduction du métabolisme de cet immunosuppresseur en métabolites actifs; 3) des vaccins, tel que celui contre *Bordetella pertussis*, ralentissent le métabolisme hépatique, le LPS contribue à la phase initiale et rapide de l'effet (Arrhenius E, 1968; Beck FJ et Whitehouse MW, 1973; Peterson TC et Renton KW, 1984; Peterson TC et Renton KW, 1986; Ansher S et coll., 1992).

4.3.1 L'inflammation locale

Une réaction inflammatoire produite à un site éloigné du foie entraîne un ralentissement de la clairance hépatique des médicaments. À ce titre, l'injection sous-cutanée de térébenthine représente un modèle classique d'inflammation locale avec ses répercussions systémiques. Ainsi, 48 heures après l'injection de térébenthine chez le rat, on note une diminution du P450 microsomal (Morgan ET, 1989). Chez le lapin, la térébenthine réduit de 50% la clairance du tolbutamide, phénomène associé à une

diminution de l'activité hydroxylase microsomale et du contenu en CYP3A6 (Parent C et coll., 1992). De façon similaire, la caséine et le nitrate d'argent entraînent une diminution de la O-dééthylation de l'éthoxycoumarine chez la souris (Ghezzi P et coll., 1986). Le granulome induit par les carragénines peut également diminuer l'activité du P450 (Endo Y et coll., 1981).

4.3.2 Les infections bactériennes et parasitaires

Des observations similaires à celles faites chez l'humain ont été rapportées chez plusieurs espèces animales. Par exemple, une infection par la bactérie responsable de la tuberculose, le *Mycobacterium tuberculosis*, produit une diminution du contenu en P450 et du métabolisme hépatique et pulmonaire chez le cochon d'Inde. (Batra JK et coll., 1987). De même, une pneumonie à *Actinobacillus pleuropneumoniae* réduit la clairance de composés dont l'antipyrine, la caféine et l'acétaminophène ainsi que le métabolisme microsomal de l'aniline, de l'éthoxyrésorufine, de la pentoxyrésorufine et de la testostérone (Monshouwer M et coll., 1995). De nombreuses études ont montré que l'administration de LPS, un constituant majeur de la paroi cellulaire des bactéries gram-négatif, réprime le P450 dans des microsomes hépatiques ainsi que l'activité associée (Morgan ET, 1997).

Différents types d'infections parasitaires entraînent également une réduction du métabolisme hépatique chez l'animal. Pour illustrer ceci, notons que l'un des parasites responsables du paludisme, *Plasmodium berghei*, cause chez l'hôte une diminution progressive du métabolisme microsomal de plusieurs substrats du P450 ainsi que de la clairance du métronidazole et de la caféine, avec un effet sélectif sur certaines isoenzymes du P450 (Kokwaro GO et coll., 1993). Des effets similaires sont produits par

Fasciola hepatica qui réduit l'activité métabolique et la clairance des composés anti-elmintiques mébendazole et thiabendazole, (Galtier P et coll., 1993).

4.3.3 L'infection virale et les inducteurs de l'interféron

L'interféron et les inducteurs de l'interféron, à l'instar d'une infection virale, sont également reconnus pour réduire le contenu hépatique en P450 et l'activité des isoenzymes dans des modèles animaux. Dès 1963, il a été montré que le virus de l'hépatite réduit le métabolisme de l'hexobarbital chez la souris (Kato R et coll., 1963). En 1976, Renton et Mannering ont rapporté que les médicaments anti-viraux, tels les IFNs, diminuent la quantité et l'activité métabolique du P450 dans les microsomes du foie de rat (Renton KW et Mannering GJ, 1976). On sait aujourd'hui que les virus, tels le virus de l'influenza et le virus de l'encéphalomyocardite, tous deux reconnus pour stimuler la relâche d'IFN- γ par les cellules du système immunitaire, possèdent cette capacité de diminuer le P450 (Morgan ET, 1997).

4.4 L'effet de l'inflammation sur le cytochrome P450

4.4.1 Les isoenzymes individuelles

Une notion générale fait aujourd'hui consensus: l'inflammation affecte de manière différentielle les isoenzymes du cytochrome P450, tant dans leur activité que dans leur niveau d'expression. Ce concept explique la sensibilité différentielle du métabolisme hépatique des multiples substrats du système cytochrome P450. Cependant, un élément de complexité s'ajoute lors de l'étude du métabolisme: souvent, plus d'une isoforme du P450 catalyse la transformation d'un médicament, rendant difficile l'identification des isoformes spécifiquement affectées par l'inflammation. Palliant cette

lacune, des substrats spécifiques à certaines isoformes ont été identifiés; de plus, des sondes moléculaires et des anticorps spécifiques servent à mesurer leur niveau d'expression et leur contenu protéique.

La majorité des études portant sur l'effet de l'inflammation sur le métabolisme rapportent que la baisse d'activité d'une isoforme du P450 s'accompagne d'une diminution des quantités de la protéine et de son ARNm. Dans ce contexte, le contrôle de l'expression génique représenterait donc le mécanisme prépondérant responsable de la diminution du métabolisme hépatique. Dans l'interprétation des données, on se doit également de tenir compte des conditions expérimentales susceptibles de conférer une certaine sélectivité quant à l'effet observé. Ainsi, les conclusions peuvent différer selon le modèle d'inflammation choisi, l'espèce animale utilisée, la nature de l'isoforme visée et les mesures à l'état basal ou induit.

Une observation apparaît fréquemment dans la littérature: l'inflammation affecte à un moindre degré le P450 total – mesuré par sa liaison au CO – que les protéines du P450 prises individuellement, ce qui suggère que certaines isoenzymes seraient moins sensibles que d'autres, ou même induites (Stanley LA et coll., 1988; Morgan ET, 1989; Sakai H et coll., 1992). Cette sélectivité revêt un intérêt particulier non seulement en toxicologie et en clinique, mais aussi parce qu'elle sous-tend l'implication de mécanismes multiples.

4.4.2 L'expression génique des isoformes du P450

In vivo, l'induction d'une réaction inflammatoire par différents stimuli tels le LPS, la térébenthine, la carragénine, les inducteurs de l'interféron et plusieurs particules irritantes diminuent l'expression génique de différentes isoformes du P450 hépatique. Un résumé de ces effets est présenté dans le tableau 4.1.

Des données expérimentales supportent l'implication de cytokines comme médiateurs sériques responsables de la répression du P450 durant une réaction inflammatoire aiguë. Premièrement, l'inflammation – e.g. celle induite par la térébenthine – augmente les concentrations plasmatiques de cytokines dont l'IL-1 et l'IL-6 (Cooper AL et coll., 1994; Fattori E et coll., 1994; Fantuzzi G et Dinarello CA, 1996), une infection virale des voies respiratoires stimule la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8, d'IL-11, du GM-CSF, du TNF- α , et des IFN- α et γ (Neuzil KM et Graham BS, 2001). Deuxièmement, plusieurs cytokines peuvent réprimer *in vivo* et *in vitro* le P450 hépatique; un sommaire de ces résultats est présenté au tableau 4.2, et une revue exhaustive de littérature couvre ce sujet (Morgan ET, 1997).

En résumé, de nombreux auteurs ont montré que *in vivo* les inducteurs de l'interféron, l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α réduisent l'activité et la quantité d'isoformes du P450 hépatique. *In vitro*, l'incubation de cytokines avec des hépatocytes en culture diminue sélectivement l'expression constitutive et/ou induite de certaines isoformes du P450 ainsi que leur niveau d'ARNm; leur puissance dépend de l'isoforme du P450 ciblée. L'ensemble de ces données confirme donc que les isoformes sont différemment affectées par les stimuli inflammatoires, et supporte l'existence de plusieurs mécanismes de répression du P450.

Tableau 4.1
Effet de l'inflammation sur l'expression du cytochrome P450

TRAITEMENT	ESPÈCE	ISOFORMES	RÉFÉRENCE
LPS ¹	rat	↓ 2C11; 2C12; 2C6; 2C7; 3A2; 2E1	Morgan ET, 1993
LPS	rat (cerveau)	↓ 2D; 2E = 1A	Renton et Nicholson, 2000
LPS	souris	↓ 2C6 (à faible dose) ↓ 3A1; 2B1 1A2 (à forte dose)	Stanley LA et coll., 1988
LPS	souris	↓ 2B9; 2B10 ↓ 2B9	Li-Masters T et coll., 2001
LPS	rat	↑ 4A1; 4A2; 4A3	Mitchell SR et coll., 2001
BaSO ₄	rat	idem ²	
Térébenthine	lapin	↓ 1A1; 1A2; 3A6	Proulx M et coll., 1995b
SEB ³	souris	↓ 1A1; 1A2; 2E1; 3A	Shedlofsky SI et coll., 2000
Inducteur de l'interféron	rat	↓ 2C11; 2C12; 1A1; 1A2; 2E1	Sakai H et coll., 1992
Carragénine	rat	↓ 2B; 2D; 2E1; 3A	Muntane-Relat J et coll., 1995
Particules irritantes (célite, BaSO ₄ , Kaolin)	rat	↓ 2C11 = 2E1; 3A2 ↑ 4A1; 4A2; 4A3	Sewer et coll., 1997

1- LPS: Lipopolysaccharides; 2- Effet attribué à l'hypophagie; 3- SEB: Entérotoxine du staphylocoque B;
 ↓: diminution ; ↑: augmentation ; =: inchangé.

Tableau 4.2
Effet des cytokines sur l'expression du cytochrome P450

CYTOKINES	ISOFORMES	RÉFÉRENCES
<i>In vivo</i>		
Inducteurs de l'interféron	↓ 1A1; 1A2	Stanley LA et coll., 1991
	↓ 2B; 2C	Cribb AE et coll., 1994
	↓ 2E1	Stanley LA et coll., 1991
	↓ 4A	Cribb AE et coll., 1994
IL-1 α	↓ 1A1; 2B1; 2C11; 2D6	Knickle LC et coll., 1992
IL-6	↓ 1A; 2B; 2C	Kurokohchi K et coll., 1992 Wright K et Morgan ET, 1991 Chen YL et coll., 1992
<i>In vitro</i>		
IL-1 β > autres cytokines	↓ 1A1; 1A2	Abdel-Razzak Z et coll., 1993 ; Clark MA et coll., 1995
IL-6 et TNF- α > IL-1 α	↓ 1A1; 1A2	Clark MA et coll., 1995 ; Abdel-Razzak Z et coll., 1993 ; Muntane-Relat J et coll., 1995
IL-1 β = IL-6 > IL-1 α et TNF- α	↓ 2B1	Clark MA et coll., 1995
IL-1 β > TNF- α = IFN- α > IL-6 > IFN- γ	↓ 2C11	Chen JQ et coll., 1995
TNF- α (non par IL-1 α et IL-6)	↓ 2D6	Muntane-Relat J et coll., 1995
IL-1 β > TNF- α > IL-1 α , IFN- γ , IL-1 α , IL-4	↓ 2E1	Muntane-Relat J et coll., 1995 ; Abdel-Razzak Z et coll., 1993
IL-6 > autres cytokines	↓ 3A	Muntane-Relat J et coll., 1995; Abdel-Razzak Z et coll., 1993
IL-1 β	↓ 4A	Parmentier JH et coll., 1997

↓: diminution.

4.4.3 L'activité du P450

Des données de la littérature indiquent la survenue d'une inactivation du cytochrome P450 lors d'une réaction inflammatoire. Ce phénomène implique une baisse de l'activité catalytique, sans diminution de la quantité en protéine. Par exemple, l'arthrite chronique chez le rat cause une baisse de l'activité microsomale hépatique associée aux CYP1A1 et 2B, alors que la teneur en ces deux protéines reste inchangée, signifiant une régulation des enzymes au niveau de leur activité spécifique (Ferrari L et coll., 1993). Notre laboratoire a montré que l'incubation de sérum provenant de lapins avec une RIA entraîne une diminution de l'activité du cytochrome P450 total et de celle des CYP1A1 et 1A2, sans changement dans la quantité de protéines. Le L-NAME, le diméthylthiourée (DMTU) et la N-acétylcystéine préviennent partiellement la baisse de l'activité du P450 par les médiateurs sériques. De plus, les inhibiteurs des anti-oxydants potentialisent l'effet du sérum alors que l'ajout de substances oxygénées réactives (SOR), tels le H₂O₂ et le nitroprussiate de sodium, inactivent le P450 dans des hépatocytes, indiquant que la diminution de l'activité du P450 par le sérum serait associée à la production de SOR (El-Kadi et coll., 2000). L'injection de LPS au cerveau entraîne une diminution de l'activité du CYP1A1 dans le foie, sans diminution de la quantité de protéine (Renton KW et Nicholson TE, 2000). La réduction de l'activité engendrée par les stimuli inflammatoires sera couverte plus en détail dans la discussion car elle fait l'objet d'études dans cette thèse.

4.5 Les mécanismes de régulation du cytochrome P450

De nombreuses études ont démontré *in vivo* et *in vitro* la régulation négative des isoformes du cytochrome P450, et dans la plupart des cas par une suppression des ARNm

encodant ces enzymes. Le mécanisme principal serait une régulation pré-traductionnelle. Effectivement, le degré de diminution de la transcription est habituellement suffisant pour expliquer la baisse de la quantité de protéines, et l'effet sur l'ARNm précède souvent celui sur la protéine. Un second mécanisme de régulation pourrait être le contrôle post-transcriptionnel au niveau de l'ARNm. Celui-ci pourrait s'effectuer à différents niveaux, mais la modulation de la durée de vie d'un ARNm impliquant des éléments d'instabilité tel le ARE ("AU-rich element") semble le plus probable. Il est à noter que la concentration à l'équilibre (steady state) d'un ARNm est en partie dépendante de sa demi-vie dans le cytoplasme, son taux de dégradation peut donc jouer un rôle prépondérant dans l'expression constitutive et inductible de certaines gènes. À ce jour, peu d'études ont porté sur la demi-vie des ARNm des CYP450. Quant à la protéine, la régulation traductionnelle, la dégradation et l'inactivation représentent des mécanismes de contrôle possibles.

Des indices suggèrent que la transcription, la stabilisation de l'ARNm, la traduction et le "turn-over" des isoformes peuvent contribuer à la réduction du niveau d'enzymes du P450 (Morgan ET, 1997).

4.5.1 La régulation au niveau des transcripts

Mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels

L'utilisation de techniques telles le buvardage Northern et la protection à la RNase pour mesurer les transcrits a permis de démontrer qu'un stimulus inflammatoire entraîne une régulation négative des ARNm de plusieurs isoformes du P450. Chez les eucaryotes, le contrôle positif ou négatif de la transcription d'un gène est généralement accompli grâce à l'interaction de protéines régulatrices avec des séquences d'ADN

spécifiques, résultant en une augmentation ou une diminution de la transcription. Ainsi, durant l'inflammation, les cytokines peuvent activer des facteurs de transcription qui se lient à des éléments de réponse spécifiques sur les gènes cibles. Les voies de signalisation empruntant les récepteurs aux cytokines et qui mènent à une diminution de la transcription seront détaillées dans la discussion, par exemple celles impliquant l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B et AP-1, le PPAR, les protéines de la famille des STAT ("signal transduction and activation of transcription"), et des MAPK ("mitogen activated protein kinase").

Des essais sur noyaux isolés par la technique de "run-on" – c'est-à-dire l'élongation de la transcription déjà initiée – ont montré une réduction de la capacité de transcription de certaines isoformes après traitement au LPS ou à la térébenthine (Daujat M et coll., 1991; Wright K et Morgan ET, 1991). L'amplitude de cet effet rend compte de la réduction du niveau d'ARNm. On ne possède cependant que peu d'arguments démontrant une régulation directe de la transcription, on ne peut donc exclure la possibilité que d'autres mécanismes soient mis en oeuvre. De la même manière, peu d'études ont porté sur la modulation de la durée de vie des ARNm comme mécanisme de répression du cytochrome P450 par les cytokines, et plusieurs des résultats obtenus demandent confirmation. On note toutefois une stabilisation des ARNm des CYP2C11 et 4A dans le foie de rat traités au LPS, et l'implication d'un mécanisme post-transcriptionnel de contrôle de l'ARNm pour le CYP2C12 dans les mêmes conditions (Morgan ET, 1989; Siewert E et coll., 2000). En utilisant l'actinomycine D pour inhiber la transcription, l'équipe de Pasco a rapporté que l'IL-1 β cause une réduction de la concentration en ARNm pour les CYP1A1 et 1A2 par inhibition du renouvellement de leur ARNm (Barker CW et coll., 1992). Le laboratoire du Pr. Maurel a montré que dans

des conditions normales, les isoformes des CYP1A1, 1A2 et 3A6 chez le lapin subissent principalement une régulation au niveau de la transcription, avec quelques effets post-transcriptionnels pour le CYP3A6 (Daujat M et coll., 1991). Considérées dans leur ensemble, les données actuelles de la littérature indiquent que la stimulation de la dégradation de l'ARNm ne serait pas un effet général de l'inflammation.

Interférence dans l'induction

La plupart des inducteurs du P450 agissent via une stimulation de la transcription, processus dans lequel les cytokines peuvent interférer. Dans la majorité des cas, l'effet des cytokines est similaire à celui produit sur l'expression constitutive, c'est-à-dire une réduction proportionnelle des niveaux d'ARNm et des quantités de protéines correspondantes, ce qui explique la baisse d'activité (Stanley LA et coll., 1991; Clark MA et coll., 1995; Muntané-Relat J et coll., 1995; Calleja C et coll., 1997). Dans le cas des CYP2 et CYP3, le mécanisme d'action de l'IL-6 implique un effet négatif au niveau de l'activation de la transcription par une régulation négative des gènes codant pour PXR et CAR. Le mécanisme implique un effet sur l'activation de la transcription des CYP1A1 et 1A2 via le récepteur Ah, et du CYP3A4 par le PPAR (Delescluse C et coll., 2000; Pascussi JM et coll., 2000). Ce thème sera repris dans la discussion de nos résultats comme mécanisme impliqué dans la répression du P450.

4.5.2 La régulation au niveau de la protéine

Quelques données expérimentales associent la régulation négative du P450 lors de l'inflammation à une réduction de la synthèse protéique et une augmentation de la dégradation (Moochhala SM et coll., 1989). Ceci semble cependant varier selon l'isoforme, le type d'inflammation et l'espèce animale étudiée. Par exemple, une

dégradation et/ou une diminution de la traduction du CYP3A6 par l'IFN- γ a été proposée comme mécanisme de régulation (Calleja C et coll., 1998). Cependant, de plus amples études sont nécessaires afin d'évaluer l'importance de ce mécanisme dans la répression du P450.

Objectifs généraux des travaux

L'objectif principal de la recherche sur les effets de l'inflammation sur le système P450 vise à mieux comprendre comment une réaction inflammatoire peut diminuer le P450, et quels sont les avantages et inconvénients potentiels d'un tel phénomène. Au niveau clinique, les buts à long terme sont de réduire l'incidence des effets secondaires des médicaments, de diminuer les coûts engendrés et de favoriser le développement d'une stratégie pour améliorer le traitement des patients souffrant de maladies inflammatoires.

Un des défis consiste à identifier les isoformes du P450 dont l'activité et l'expression sont plus sévèrement affectées durant l'infection et l'inflammation afin de prédire les interactions cliniques possibles entre la maladie et la médication. Ceci requiert: 1- de connaître les isoenzymes impliquées dans le métabolisme d'un agent donné; 2- de comprendre comment ces enzymes sont affectées dans différents modèles d'infection et d'inflammation; et 3- de pouvoir extrapoler à l'humain les observations faites chez l'animal.

L'objectif immédiat consiste à identifier les médiateurs responsables de la baisse du P450 hépatique dans différents modèles d'inflammation, et les isoformes affectées. Il est également important de déterminer les voies de transduction du signal mises en jeu après la liaison de ces médiateurs à leur récepteurs et de cibler les divers mécanismes qui

mènent à la régulation négative du P450, soit un effet sur la protéine elle-même (modification post-traductionnelle) ou au niveau de l'expression des gènes des CYP.

À ce jour, les mécanismes de régulation de l'activité et de l'expression des gènes du P450 en conditions normales demeurent en partie inconnus; l'identification des facteurs impliqués durant l'inflammation devrait fournir des informations supplémentaires permettant de mieux comprendre les mécanismes mis en oeuvre chez les sujets sains.

Objectifs spécifiques des travaux de doctorat

Comme étapes vers l'atteinte de ces buts à long terme, nous avons poursuivi les objectifs spécifiques suivants:

- 1- Déterminer et comparer les effets produits par les sérums issus de 2 modèles d'inflammation différents – inflammation locale vs infection virale – sur l'activité et l'expression des isoformes du cytochrome P450 dans des hépatocytes en culture.
 - Évaluer les effets sur les CYP1A1 et 1A2 qui sont impliqués dans le métabolisme de la théophylline et sur le CYP3A6, l'isoforme retrouvée en plus grande quantité dans le foie.
 - Évaluer l'effet des sérums en fonction de la susceptibilité intrinsèque des hépatocytes, i.e. provenant de lapins normaux ou de lapins ayant une réaction inflammatoire aiguë.
- 2- Identifier les médiateurs présents dans ces sérums qui causent une baisse d'activité et d'expression du cytochrome P450.

- 3- Déterminer les mécanismes de régulation de l'expression des isoformes du P450 qui mènent à la répression lors de l'inflammation: au niveau de l'ARNm ou de la protéine.
- 4- Déterminer l'effet d'une infection grippale chez l'humain sur le métabolisme *in vivo* de la théophylline, et comparer cet effet avec la baisse du P450 hépatique observée *in vitro* suite à l'incubation des sérums provenant des mêmes sujets avec des hépatocytes en culture.

DEUXIÈME PARTIE

PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

CHAPITRE 5

CYTOCHROME P450 INACTIVATION BY SERUM FROM HUMANS WITH A VIRAL INFECTION AND SERUM FROM RABBITS WITH A TURPENTINE-INDUCED INFLAMMATION: THE ROLE OF CYTOKINES

Anne-Marie Bleau, Mihaela C. Levitchi, Hélène Maurice and Patrick du Souich*

British Journal of Pharmacology 130(8): 1777-1784, 2000.

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montréal, Montréal,
Québec, Canada

Summary

1. Serum from humans with an acute upper respiratory viral infection and from rabbits with turpentine-induced inflammation reduce the catalytic activity of hepatic cytochrome P450 (P450). The aim of this study was to identify the serum mediators responsible for the decrease in P450 activity.
2. Rabbit and human sera were fractionated by size exclusion chromatography and the fractions tested for their ability to reduce the activity and amount of P450 after 4 h of incubation with hepatocytes from turpentine-treated rabbits (H_{INF}). Rabbit and human sera decreased P450 activity by around 40% without any change in the amount of CYP1A1 and 1A2 apoproteins.
3. In rabbit serum, the fraction containing proteins of Mr 23-15 kDa decreased P450 content by 41%, but did not alter the amount of the apoproteins. Anti-IL-6 antibody added to the Mr 23-15 kDa fraction restored P450 content to 97% of control values, while anti-IL-1 β , TNF- α and IFN- γ antibodies had no effect. Supporting the role of IL-6, incubation of H_{INF} in the presence of IL-6 for 4 h reduced P450 content by 40%.
4. In human serum, the fraction containing proteins of Mr >95 kDa lowered P450 content by 43% without modifying the amounts of CYP1A1/2. Neutralisation experiments showed that IFN- γ , IL-6, and IL-1 β contributed to the decrease in P450 content.
5. In conclusion, the present results demonstrate that IL-6, and IFN- γ , IL-6 and IL-1 β are the serum mediators released *in vivo* by a turpentine-induced inflammatory reaction in the rabbit and an upper respiratory viral infection in humans, respectively, inactivating hepatic P450.

Abbreviations anti- antibody against-; H_{CONT} hepatocytes from control rabbits; H_{INF} hepatocytes of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction; HPLC high- performance liquid chromatography; IFN- γ interferon- γ ; IL-1 β interleukin-1 β ; IL-6 interleukin-6; Mr molecular mass, relative; P450 cytochrome P450; SDS sodium dodecyl sulfate; TNF- α tumor necrosis factor- α ; WME William's medium E.

Keywords: cytochrome P450, inflammation, serum mediators, cytokines, human, rabbit

Introduction

In humans, inflammation and infection modify the function of the liver, i.e. there is an increase in the synthesis and secretion of acute phase proteins (Schreiber *et al.*, 1982), and a decrease in the synthesis of other proteins, such as albumin and enzymes of the cytochrome P450 (P450) (Morgan, 1997). As a consequence, the rate of drug metabolism may be reduced in the presence of an inflammatory reaction or an infection (Kobusch *et al.*, 1986), a situation that may cause drug toxicity (Chang *et al.*, 1978). In animal models, non-infectious inflammatory reactions, such as those induced by turpentine, also down-regulate several hepatic P450 isoforms (Parent *et al.*, 1992; Morgan, 1989). We have reported that serum from humans with an acute upper respiratory tract viral infection and from rabbits with a turpentine-induced acute inflammatory reaction contain mediators that reduce the catalytic activity of the P450 of cultured hepatocytes, effect that is detected within 4 h of incubation (El-Kadi *et al.*, 1997).

Numerous reports have proposed that pro-inflammatory cytokines and mediators of the hepatic acute-phase response, notably interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), may be major contributors to the decline of hepatic P450 content (Abdel-Razzak *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1995). The ability of these cytokines to depress hepatic P450 has been documented *in vivo* after their administration to animal models or *in vitro* following their incubation with hepatocytes; these cytokines appear to act mainly on P450 gene expression at a transcriptional level (Morgan, 1997).

Despite the fact that viral infections and a turpentine-induced acute inflammatory reaction enhance plasma levels of many cytokines (Neuzil and Graham, 1996; Yamashita *et al.*, 1994), there is no direct *in vivo* evidence supporting that under these two conditions, cytokines are the serum mediators affecting the expression of P450 isoforms. Furthermore, there is no evidence that the cytokines contained in the serum from humans or rabbits with an inflammatory reaction can rapidly inactivate hepatic P450.

The aims of this study were to assess how serum mediators in patients with an upper respiratory tract viral infection and in rabbits with a turpentine-induced acute inflammatory reaction reduce P450 content and activity, and to document whether these serum mediators are cytokines, more specifically IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α . For this purpose, P450 content and amount of CYP1A1/2 and 3A6 were assessed after 4 h of incubation of the sera with hepatocytes. In addition, mediators in sera were isolated by size exclusion high-performance liquid chromatography and cytokines identified by direct neutralisation with antibodies.

Materials and Methods

Hepatocyte isolation and culture

Male New Zealand rabbits (2-2.3 kg) (n = 13) from the Ferme Cunicole (St. Valérien, Qc, Canada) were housed in separate cages for at least 7 days before use. A local inflammatory reaction was induced by the s.c. injection of 5 ml of turpentine at two distinct sites of the back of the rabbits. The severity of the inflammatory reaction was assessed by measuring the concentrations of seromuroids (Parent *et al.*, 1992). All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of laboratory animals.

Hepatocytes were isolated 48 h after the injection of turpentine by means of the two step liver perfusion method of Seglen (1976), with minor modifications (El-Kadi *et al.*, 1997). Rabbits were anaesthetised with sodium pentobarbital 30 mg kg⁻¹, and after a laparotomy, the portal and inferior cava veins were cannulated. The liver was first perfused *in situ* via the portal vein with a washing solution containing 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 5.5 mM glucose and 56.8 mg ml⁻¹ heparin, followed by perfusion with a solution of 0.013% collagenase, 1 mM CaCl₂ and 0.25 mM trypsin inhibitor. Living cells were isolated on a 40% Percoll gradient. Viability was >90% as assessed by trypan blue exclusion, and the cell concentration was adjusted to 4x10⁶ ml⁻¹ with William's medium E (WME) supplemented with 10% calf serum and 1 mM insulin. Aliquots of 2 ml of the hepatocytes in suspension were transferred into 12-well plastic culture plates (Falcon, Becton Dickinson Labware, Rutherford, NJ) coated with type I rat tail collagen and incubated for 4 h at 37°C in an atmosphere of 95% O₂/5% CO₂.

Rabbit and human serum preparation

A blood sample (10 ml) was withdrawn from the rabbits 48 h after the s.c. injection of turpentine in a sterile Vacutainer Brand SST (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). Human blood was obtained from volunteers (n = 6) at the apex of the clinical symptomatology of a common cold, usually 24 h after overt manifestations of a viral infection of the upper respiratory tract, such as rinorrhea, sneezing, nasal congestion, sore throat, cough and systemic signs of malaise in absence of purulent secretions. Blood samples were allowed to clot at room temperature for 2 h, and thereafter were centrifuged at 2500 r.p.m. for 5 min, and the serum was decanted and stored frozen at -20°C in 1 ml aliquots until use.

Fractionation of serum proteins

Serum proteins were separated by size exclusion high-performance liquid chromatography (HPLC) on a Superose 12 HR column from Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, Qc., Canada). Column pressure was maintained between 8 to 10 bar, flow rate was set at 0.3 ml min⁻¹ with a LKB 2150 HPLC pump (Bromma, Sweden) and absorbance was measured at 280 nm with a Waters 490E spectrophotometric detector (Millipore, Milford, MA). The eluent buffer contained 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 1mM HEPES, 25 mM EGTA and 5.5 mM glucose; this solution was adjusted to pH 7.4 and filtered through a 0.22 µm membrane. To calculate the Mr of the serum proteins contained in each HPLC fraction, a calibration curve was established by injecting 300 µl of buffer containing a mixture of six standard proteins (100 µg ml⁻¹): L-glutamic dehydrogenase (55.6 kDa), aldolase (39.2 kDa), triosephosphate isomerase (26.6 kDa), trypsin inhibitor (26.6 kDa), cytochrome c (12.5 kDa) and aprotinin (6.5 kDa). Serum aliquots of 300 µl were injected into the column and fractions of 1.2 ml were collected

with a fraction collector (LKB 2211 Superrac). Since the column could not separate proteins in the high Mr region, the proteins contained in the first fraction were designated as Mr >95 kDa.

In order to increase the sensitivity, collected fractions were concentrated on Microsep 3K membranes (Pall Filtron, Northborough, MA) which retain proteins of more than 3 kDa. In the first set of experiments, the whole fraction (1.2 ml) was transferred into the sample reservoir and centrifuged at 7500 g for approximately 30 min, until 600 µl remained on top of the membrane. The retentate was repeatedly pulled in and out of a micropipette to remove the proteins adsorbed onto the membrane. This provided the equivalent of a serum diluted 1:2. The same procedure was used to obtain more concentrated fractions, i.e. 3 ml of the fraction were added to the sample reservoir, and the volume was reduced to 600 µl to concentrate serum fractions 1.25 times.

Determination of cytochrome P450 content

The efficacy of the serum and HPLC fractions to reduce hepatic P450 content was tested by incubating for 4 h 200 µl of serum or the HPLC fractions with hepatocytes of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (El-Kadi *et al.*, 1997). Hepatic P450 content was measured spectrophotometrically as described by Omaru and Sato (1964). Amount of proteins in hepatocytes was measured by the method of Lowry *et al.* (1951).

The effect of the serum from rabbits (n = 6) and humans (n = 6) on the activity of CYP1A1 and 1A2 was determined by measuring the ability of P450 to metabolise theophylline and generate 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) (Sarkar & Jackson, 1994; Kurdi *et al.*, 1999). Theophylline

was dissolved in serum-free WME, and 100 μ l were added to each well containing the hepatocytes to attain a final concentration of 176 μ M. At time zero, 350 μ l of the supernatant were collected from each well (control sample), and following 4 h of incubation, the remaining incubation medium was collected and frozen at -20°C until theophylline, 3MX, 1MU, and 1,3DMU were assayed by high performance liquid chromatography (du Souich *et al.*, 1989).

Western Blot analysis

Proteins were 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 semidry transfer process (Bio-Rad, Hercules, CA). CYP1A1 and 1A2 proteins were detected with a specific polyclonal anti-rabbit CYP1A1, and visualised with an alkaline phosphatase (AP) conjugated secondary goat antibody using nitro blue tetrazolium as the substrate (Kruger, 1994). CYP3A6 protein was detected with a monoclonal anti-rat CYP3A1 and a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, and chemiluminescence was visualised by autoradiography (Thorpe *et al.*, 1985). The intensities of the bands were measured with a software Alphaimager version 3.24.

Immuno-neutralization of cytokines

One polyclonal and four monoclonal antibodies against cytokines were used in an attempt to neutralise the decrease in P450 content induced by the serum and HPLC fractions. To immuno-neutralise rabbit serum mediators, the following antibodies were used: a goat anti-rabbit interleukin- 1β (anti-rbIL- 1β antibody), monoclonal antibodies against human interleukin-6 (anti-IL-6) and human interferon- γ (anti-IFN γ), and a sheep

anti-human tumor necrosis factor- α (anti-TNF- α). The antibodies against human cytokines were used to neutralise the homologous rabbit cytokines because of the known inter-species reactivity of these antibodies (Herbertson *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1997; Muscettola *et al.*, 1995). The same antibodies against human cytokines as well as a monoclonal anti-human interleukin-1 β (anti-hIL-1 β antibody) were used to neutralise the mediators in human serum fractions. These antibodies were used because no significant cross-reactivity or interference is observed among them or with other cytokines as indicated by the supplier. An irrelevant monoclonal antibody (IgG to *Pseudomonas aeruginosa*) served as control. Aliquots of 2 μ g of each antibody were added individually to 200 μ l of the HPLC fractions showing a P450 inhibitory activity, and incubated at 37°C for 1 h. The combination of the four antibodies was incubated only with the serum from humans and from rabbits with an inflammatory reaction. Antibody-treated sera or HPLC fractions were added to the hepatocytes at the beginning of the 4 h-incubation period.

Effect of IL-6 on P450 content

To confirm that IL-6 has the capacity to inactivate hepatic P450, human recombinant IL-6 (10 ng ml⁻¹) was incubated for 4 hours with hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (n = 5). The effect of IL-6 was assessed by measuring P450 content (Omura & Sato, 1964). The concentration of IL-6 used was similar to that assayed in the plasma of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (Turnbull *et al.*, 1999).

Drugs and chemicals

The Percoll gradient, William's medium E, calf serum, type I rat tail collagen, NaCl, KCl, KH_2PO_4 , HEPES, EGTA, glucose, theophylline, 3MX, 1MU and 1,3DMU were purchased from Sigma Chemicals (Sigma, St. Louis, MO), insulin from Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim, Germany), and L-glutamic dehydrogenase, aldolase, triosephosphate isomerase, trypsin inhibitor, cytochrome c and aprotinine from Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, Qc., Canada). Human recombinant IL-6 was obtained from Sandoz Canada Inc. (Markham, Ontario, Canada), the polyclonal anti-rabbit CYP1A1 and the monoclonal anti-rat CYP3A1 from Oxford Biochemical Research (Oxford, MI), the goat anti-rabbit IL-1 β from Cedar Lane (Hornby, ON, Canada), the monoclonal antibodies against human IL-6 and human IFN- γ from R&D Systems (Minneapolis, MN). The sheep anti-human TNF- α antibody was graciously given by Protherics Inc. (formerly Therapeutic Antibodies, Nashville, TN). Finally, the monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* was kindly given by Dr J. Lagacé (Université de Montréal).

Statistical analysis

All data are reported as means \pm s.e. Comparisons between treatment groups were carried out using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls *post hoc* test. The differences were considered statistical significantly with a probability $p < 0.05$.

Results

Effect of the inflammatory reaction on P450 content and activity and amount of P450 isoforms

In the group of rabbits ($n = 6$) with a turpentine-induced inflammatory reaction, mean seromucoid concentration was $83.5 \pm 2.5 \text{ mg dl}^{-1}$ compared with $21.9 \pm 2.5 \text{ mg dl}^{-1}$ in control rabbits ($p < 0.05$). In hepatocytes of control rabbits, P450 content was $0.47 \pm 0.09 \text{ nmol mg}^{-1}$ of protein. In H_{INF} , P450 content was reduced to $0.20 \pm 0.03 \text{ nmol mg}^{-1}$ of protein ($p < 0.05$). Compared with control rabbits, the turpentine induced inflammatory reaction diminished the amount of CYP1A1 and CYP1A2 apoproteins by 39% and 44%, respectively, and the amount of CYP3A6 apoprotein to almost undetectable levels (Fig 5.1). The reduction in CYP1A1 and 1A2 is reflected by a decrease in the amount of theophylline metabolites produced (Table 5.1).

Effect of serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction and HPLC fractions on P450 content and activity

Incubation of hepatocytes from control rabbits with serum from rabbits with an inflammatory reaction or with the HPLC fractions did not modify P450 content. In contrast, following 4 h of incubation of H_{INF} with serum from rabbits with an inflammatory reaction ($n = 6$), P450 content decreased by 30% ($p < 0.05$) (Fig 5.2). In parallel, the amount of theophylline metabolites formed by H_{INF} decreased in presence of serum from rabbits with an inflammatory reaction ($n = 6$) (Table 5.1).

Because of the inherent dilution effect of HPLC, the serum components eluted in each fraction were diluted approximately 1:4 compared with their original serum

concentration. Incubation of H_{INF} with the diluted HPLC fractions did not affect P450 content, although the fraction corresponding to the M_r of 23-15 kDa induced a decrease of 21% in P450 content, reduction that did not reach statistical significance ($p > 0.05$). When the HPLC fractions were concentrated to obtain the equivalent of a serum diluted 1:2, the fraction including proteins with a M_r of 23-15 kDa decreased P450 content by 39%, even though this diminution did not reach statistical significance. The incubation of more concentrated fractions, i.e. equivalent to 1.25 times the serum ($n = 6$), demonstrated that the fraction including proteins with a M_r of 23-15 kDa diminished P450 content by 41% ($p < 0.05$) (Fig 5.2).

The addition of serum from rabbits with an inflammatory reaction or the corresponding HPLC concentrated x1.25 fractions ($n = 3$) to H_{INF} did not decrease the amount of CYP1A1 and CYP1A2 apoproteins (Fig 5.3 A). It was not possible to assess the effect of serum on CYP3A6 apoprotein since the baseline amount was barely detectable.

Effect of serum from humans with a viral infection and HPLC fractions on P450 content and activity

Human serum from individuals with an upper respiratory tract viral infection reduced the formation of theophylline metabolites in H_{INF} by around 40% ($p < 0.05$) (Table 5.1). In diluted HPLC fractions, the ability to decrease P450 content was present in the fractions containing proteins of $M_r > 95$ kDa and 23-15 kDa. The HPLC concentrated fraction (x1.25) ($n = 6$), including proteins with a $M_r > 95$ kDa, reduced P450 content in H_{INF} by 43% ($p < 0.05$). On the other hand, the fraction containing proteins with a M_r of 23-15 kDa tended to decrease P450 content, but this effect did not reach statistical

significance ($p > 0.05$) (Fig 5.4). The addition of serum from human with a viral infection or the concentrated $\times 1.25$ Mr > 95 kDa fraction to H_{INF} did not decrease the amount of CYP1A1 and CYP1A2 apoproteins (Fig 5.3B).

Identification of the mediators in serum from rabbits with an inflammatory reaction responsible for the inactivation of the P450

Compared with H_{INF} alone, the addition of serum from rabbits with an inflammatory reaction or the concentrated $\times 1.25$ Mr 23-15 kDa fraction ($n = 7$) reduced P450 content in H_{INF} by 22 and 29%, respectively ($p < 0.05$) (Fig 5.5). The addition of anti-IL-1 β antibodies to the concentrated $\times 1.25$ Mr 23-15 kDa fraction did not prevent the diminution in P450 content. On the other hand, the addition of anti-IL-6 antibodies restored the P450 content to 97% of the amount measured in H_{INF} . Confirming the role of IL-6, incubation of H_{INF} with recombinant human IL-6 for 4 h elicited a 40% decrease ($p < 0.05$) in P450 content (Fig 5.2). Neither anti-IFN- γ or anti-TNF- α antibodies elicited any protection against the inactivation produced by the concentrated $\times 1.25$ Mr 23-15 kDa fraction.

When all four antibodies were added to the serum from rabbits with an inflammatory reaction ($n = 7$), and thereafter incubated with H_{INF} , the extent of the protection did not reach that elicited by the anti-IL-6 antibody alone added to the concentrated $\times 1.25$ Mr 23-15 kDa fraction, i.e. it restored the P450 content back to 89% of that measured with the H_{INF} incubated alone. The addition of the control monoclonal antibody to the concentrated $\times 1.25$ Mr 23-15 kDa fraction did not modify its ability to modify P450 content.

Identification of mediators in serum from humans with a viral infection responsible for the inactivation of the P450

Compared with H_{INF} alone, the addition of serum from humans with a viral infection or the concentrated $\times 1.25$ Mr >95 kDa fraction ($n = 8$) to H_{INF} reduced P450 content by 21 and 32% respectively ($p < 0.05$) (Fig 5.6). The addition of anti-IL-1 β , anti-IL-6 and anti-IFN- γ antibodies individually to the concentrated $\times 1.25$ Mr >95 kDa fraction restored P450 content to 89%, 93% and 99%, respectively, of the values measured in H_{INF} alone. The anti-TNF- α antibody and the monoclonal antibody used as control were not able to prevent the reduction in P450 induced by the addition of the concentrated $\times 1.25$ Mr >95 kDa fraction. The mixture of the four antibodies added to serum from human with a viral infection almost completely restored the P450 content value, i.e. back to 93% of that observed in the H_{INF} incubated alone.

Discussion

Incubation of H_{INF} for 4 h with serum from rabbits with an inflammatory reaction or humans with a viral infection reduces P450 content and the formation of theophylline metabolites. The reduction in P450 catalytic activity occurs without any change in CYP1A1 and 1A2 amounts, suggesting that the activity of these proteins are inactivated. In the serum from rabbits with an inflammatory reaction, IL-6 accounts for most of the decrease in hepatic P450 content, and incubation of IL-6 with H_{INF} supports that this cytokine is capable of reducing hepatic P450. These results suggest that besides the well known functions of IL-6 in the turpentine-induced inflammatory reaction, i.e. of transcriptional induction of acute phase response genes in the liver, repression of albumin synthesis (Moshage, 1997), and *in vivo* and *in vitro* repression of P450 at the gene level in

human and rat hepatocytes (Abdel-Razzak *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1995), serum IL-6 is able to induce the inactivation of several P450 isoforms in primed hepatocytes. These results do not discard a role for IL-1 β and TNF- α in the turpentine-induced down-regulation of P450 *in vivo*, since these cytokines may be necessary to promote the secretion of IL-6 (Luheshi *et al.*, 1997).

In humans, influenza A and B, and influenza-like infections trigger the release of IFN- γ (Ennis *et al.*, 1981), IL-6, IL-1 β and TNF- α (Lehmann *et al.*, 1996; Van Reeth *et al.*, 1998). The present results show that in serum from humans with a viral infection, IFN- γ , IL-6 and IL-1 β contribute to the inactivation of the P450 of H_{INF}. The ability of IFN- γ to inactivate the P450 appears greater than that of IL-6 and IL-1 β . Supporting that IFN- γ has a predominant role, in humans, the increase in plasma levels of IFN- γ induced by an acute viral respiratory infection is associated with a reduction in the clearance of antipyrine (Ramshaw *et al.*, 1997), and administration of IFN- γ to humans down-regulates P450 (Horsmans *et al.*, 1994). Furthermore, in IL-6-deficient mice, symptoms of sickness to influenza infection are still present, suggesting that the role of IL-6 in viral aggression is relatively less important than that of other cytokines (Kozak *et al.*, 1997). We can not ascertain that only IFN- γ , IL-6 and IL-1 β account for the inactivation of the P450 since other cytokines known to depress P450 *in vitro* have not been tested in the present study, i.e. IL-2, IL-4, oncostatin-M, epidermal growth factor, and transforming growth factor- β 1 (Abdel-Razzak *et al.*, 1993; Guillen *et al.*, 1998; Morgan 1997).

Serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction does not inactivate P450 of H_{CONT}, but inactivates P450 of H_{INF}, and serum from humans with a viral infection inactivates P450 from both H_{CONT} and H_{INF}. Several reasons may explain such differences, but essentially the number of serum mediators and a greater density of

surface receptors available to each mediator. In primed hepatocytes, i.e. those harvested from rabbits with an inflammatory reaction, the density of surface receptors to cytokines is greater than in control hepatocytes (Dinarello, 1994). Rabbit serum presenting a single mediator may require a greater higher of surface receptors to this single cytokine than human serum that contains at least three cytokines contributing to P450 inactivation. Supporting such explanation is the fact that human serum has a greater potency to inactivate P450 in H_{INF} than does serum from rabbits (El-Kadi et al., 1997).

Contrasting with the active HPLC fraction of serum from rabbits with an inflammatory reaction, the activity of the HPLC fraction of serum from humans with a viral infection resides in the fraction containing proteins with a Mr greater than 95 kDa. α 2-Macroglobulin is a 720 kDa homotetramer that functions as proteinase inhibitor and as binding protein for several regulatory polypeptides including active cytokines (Sottrup-Jensen, 1989). IL-6 binds to α 2-macroglobulin which acts as a carrier protein; bound IL-6 is protected from hydrolysis by proteases, it retains its activity and its ability to bind to its receptor, and this binding does not interfere with its immunoassay (Matsuda *et al.*, 1989). α 2-Macroglobulin also binds IL-1 β (Borth & Luger, 1989) and IFN- γ (James *et al.*, 1992) without inhibiting their biological activity. IFN- γ affinity for native α 2-macroglobulin is low (Crookston *et al.*, 1994), implying that IFN- γ bound to α 2-macroglobulin must be released easily from the complex, and this might explain the effectiveness of IFN- γ to inactivate the P450. On the other hand, cytokines such as IL-6 (May *et al.*, 1992), IL-1 (Moshage, 1997) and IFN- γ (Gaillard *et al.*, 1993) can also circulate in the blood complexed with the soluble forms of their receptors.

The ability of the cytokines in the serum from rabbits with an inflammatory reaction and in the serum from humans with a viral infection to diminish *ex vivo* the P450

catalytic activity differs from the ability of individual cytokines to down-regulate P450 isoforms when tested *in vitro*. When cytokines are incubated with hepatocytes, IL-1 β is the cytokine with the greater ability to depress isoforms such as CYP1A1, 1A2, 2B1, 2C, 2E1 and 4A (Abdel-Razzak *et al.*, 1993; Yamashita *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1995; Parmentier *et al.*, 1997). Moreover, according to our results, TNF- α does not contribute directly to the inactivation of the P450, however *in vitro* it depresses CYP1A1/2, 2C, 2D (Abdel-Razzak *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1995). This apparent discrepancy could be secondary to various factors, such as the experimental model, including the duration of the incubation, differences in the concentrations of the cytokines between *ex vivo* and *in vitro* studies, and the presence of other compounds in the serum affecting P450 activity. This last possibility is supported by the fact that when the four antibodies are added together into the serum, the ability of the serum to inactivate the P450 is less affected than when the individual antibodies are added. We might speculate that the cross-talk between signalling pathways of cytokines with overlapping functions but with selective effects on P450 isoforms (Abdel-Razzak *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1995) is responsible for this apparent contradiction.

In conclusion, a localised tissue inflammation caused by the injection of turpentine induces the secretion of serum mediators, mainly IL-6, that inactivate hepatic P450 following a 4 h period incubation. On the other hand, an upper respiratory viral infection in humans induces the secretion of several mediators with different abilities to inactivate hepatic P450, i.e. IFN- γ > IL-1 β > IL-6. TNF- α does not appear to contribute directly to the inactivation of hepatic P450 in either the turpentine or the viral inflammatory reactions.

Acknowledgements

This work was supported by the Medical Research Council of Canada (Grant # MT-14478). The sheep anti-human tumor necrosis factor- α was generously provided by Protherics Inc. (formerly Therapeutic Antibodies, Nashville, TN). The technical assistance of Mrs Lucie Héroux is gratefully acknowledged.

References

- ABDEL-RAZZAK, K., LOYER, P., FAUTREL, A., GAUTHIER, J.C., CORROS, L., TURLIN, B., BEAUNE, P. & GUILLOUZO, A. (1993). Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol. Pharmacol.* **44**, 707-715.
- BORTH, W. & LUGER, T.A. (1989). Identification of alpha 2-macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. Binding of interleukin-1 beta to "F" alpha 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **264**, 5818-5825.
- CHANG, K.C., LAUER, B.A., BELL, T.D. & CHAI, H. (1978). Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness. *Lancet* **1**, 1132-1133.
- CHEN, J.Q., STRÖM, A., GUSTAFSSON, J.A. & MORGAN, E.T. (1995). Suppression of the constitutive expression of cytochrome P450 2C11 by cytokines and interferon in primary cultures of rat hepatocytes, comparison with induction of acute-phase genes and demonstration that CYP2C11 promotor sequences are involved in the suppressive response to interleukine 1 and 6. *Mol. Pharmacol.* **47**, 940-947.
- CLARK, M.A., BING, B.A., GOTTSCHALL, P.E. & WILLIAMS, J.F. (1995). Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-methylcholantrene

- induction of P450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 97-104.
- CROOKSTON, K.P., WEBB, D.J., WOLF, B.B. & GONIAS, S.T. (1994). Classification of α_2 -macroglobuline-cytokine interaction based on affinity of noncovalent association in solution under apparent equilibrium conditions. *J. Biol. Chem.* **269**, 1533-1540.
- DINARELLO, C.A. (1994). The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.*, **8**, 1314-1325.
- DU SOUICH, P., HOEN, B., SAUNIER, C., HARTEMANN, D., SAUTEGEAU, A., CORNETTE, A., DELORME, N., POLU, J.M. & SADOUL, P. (1989). Theophylline disposition in patients with COLD with and without hypoxemia. *Chest*, **95**, 1028-1032.
- EL-KADI, A.O.S., MAURICE, H., ONG, H. & DU SOUICH, P. (1997). Down-regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of mediators in human and animal serum and in the liver. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 1164-1170.
- ENNIS, F.A., MEAGER, A., BEARE, A.S., QI, Y., RILEY, D., SCHWARZ, G., SCHILD, G.C. & ROOK, A.H. (1981). Interferon induction and increased natural killer-cell activity in influenza infections in man. *Lancet* **2**, 891-893.
- GAILLARD, J.P., BATAILLE, R., BRAILLY, H., ZUBER, C., YASUKAWA, K., ATTAL, M., MAURO, N., TAGA, T., KISHIMOTO, T. & KLEIN, B. (1993). Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *Eur. J. Immunol.* **23**, 820-824.
- GUILLEN, M.I., DONATO, M.T., JOVER, R., CASTELL, J.V., FABRA, R., TRULLENQUE, R. & GOMEZ-LECHÓN, M.J. (1998). Oncostatin M down-

- regulates basal and induced cytochromes P450 in human hepatocytes. *J. Exp. Pharmacol. Ther.* **285**, 127-134.
- HERBERTSON, M.J., WERNER, H.A., GODDARD, C.M., RUSSELL, J.A., WHEELER, A., COXON, R. & WALLEY, K.R. (1995). Anti-tumor necrosis factor- α prevents decreased ventricular contractility in endotoxemic pigs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 480-488.
- HORSMANS, Y., BRENARD, R. & GEUBEL, A.P. (1994). Short report: interferon-alpha decreases ¹⁴C-aminopyrine breath test values in patients with chronic hepatitis C. *Alim. Pharmacol. Ther.* **8**, 353-355.
- HUANG, W.T., LIN, M.T. & WON, S.J. (1997). Staphylococcal enterotoxin A-induced fever is associated with increased circulating levels of cytokines in rabbits. *Inf. Immunol.* **65**, 2656-2662.
- JAMES, K., VAN DEN HAAN, J., LENS, S. & FARMER, K. (1992). Preliminary studies on the interaction of TNF α and IFN γ with α_2 -macroglobuline. *Immunol. Lett.* **32**, 49-58.
- KOBUSCH, A.B., ERILL, S. & DU SOUICH, P. (1986). Relationship between changes in seromuroid concentrations and the rate of oxidation or acetylation of several substrates. *Drug Metab. Dispos.* **14**, 153-157.
- KOZAK, W., POLI, V., SOSYNSKI, D., CONN, C.A., LEON, L.R. & KLUGER, M.J. (1997). Sickness behaviour in mice deficient in interleukine-6 during turpentine abscess and influenza pneumonitis. *Am. J. Physio.* **272**, R621-630.
- KRUGER, N.J. (1994). Detection of polypeptides on immunoblots using secondary antibodies or protein A. *Methods Mol. Biol.* **32**, 215-226.
- KURDI, J., MAURICE, H., EL-KADI, A.O.S., ONG, H., DALKARA, S., BELANGER, P.M. & DU SOUICH, P. (1999). Effect of hypoxia alone or combined to

- inflammation and 3-methylcholanthrene on the cytochrome P450 in conscious rabbits. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 365-373.
- LEHMANN, C., SPRENGER, H., NAIN, M., BACHER, M. & GEMSA, D. (1996). Infection of macrophages by influenza A virus: characteristics of tumour necrosis factor-alpha (TNF alpha) gene expression. *Res. Virol.* **147**, 123-130.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- LUHESHI, G.N., STEFFERI, A., TURNBULL, A.V., DASCOMBE, M.J., BROUWER, S., HOPKINS, S.J. & ROTHWELL, N.J. (1997). Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and IL-6 and TNF-alpha in the rat. *Am. J. Physiol.* **272**, R862-868.
- MATSUDA, T., HIRANO, T., NAGASAWA, S. & KISHIMOTO, T. (1989). Identification of α_2 -macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *J. Immunol.* **142**, 148-152.
- MAY, L.T., VIGUET, H., KENNEY, J.S., IDA, N., ALLISON, A.C. & SEHGAI, P.B. (1992). High levels of "complexed" interleukin-6 in human blood. *J. Biol. Chem.* **267**, 19698-19704.
- MORGAN, E.T. (1989). Suppression of constitutive cytochrome P450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxine. *Mol. Pharmacol.* **36**, 669-707.
- MORGAN, E.T. (1997). Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab. Rev.* **29**, 1129-1188.
- MOSHAGE, H. (1997). Cytokines and the hepatic acute phase response. *J. Pathol.* **181**, 257-266.

- MUSCETTOLA, M., GIROLAMI, L., TANGANELLI, C., FONTANI, G. & LUPO, C. (1995). Immune and endocrine aspects of behaviour in male rabbits. *Neuroimmunomodul.* **2**, 155-160.
- NEUZIL, K.M. & GRAHAM, B.S. (1996). Cytokine release and innate immunity in respiratory viral infection. *Virology* **7**, 255-264.
- OMURA, T. & SATO, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378.
- PARENT, C., BÉLANGER, P.M., JUTRAS, L. & DU SOUICH, P. (1992). Effect of inflammation on the rabbit hepatic cytochrome P450 isoenzymes: Alterations in the kinetics and dynamics of tolbutamide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**, 780-787.
- PARMENTIER, J.H., SCHOHN, H., BRONNER, M., FERRARI, L., BATT, A.M., DAUCA, M. & KREMERS, P. (1997). Regulation of CYP4A1 and peroxisome proliferator-activated alpha expression by interleukine-1beta, interleukine-6, and dexamethasone in cultured fetal hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 889-898.
- RAMSHAW, I.A., RAMSAY, A.J., KARUPIAH, G., ROLPH, M.S., MAHALINGAN, S. & RUBY, J.C. (1997). Cytokines and immunity to viral infectious. *Immunol. Rev.* **159**, 119-135.
- SARKAR, M.A. & JACKSON, B.J. (1994). Theophylline N-demethylations as probes for P4501A1 and P4501A2. *Drug Metab. Dispos.* **22**, 827-834.
- SCHREIBER, G., KLOWETT, G., NAGASHIMA, M., MILLERSHINGE, A., MARTIN, H., URBAN, J. & KOTLER, L. (1982). The acute phase response of plasma protein synthesis during experimental inflammation. *J. Biol. Chem.* **257**, 10271-10277.
- SEGLEN, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell. Biol.* **13**, 29-83.

- SMITH, B.J. (1994). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of protein. *Methods Mol. Biol.* **32**, 23-34.
- SOTTRUP-JENSEN, L. (1989). α -macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J. Biol. Chem.* **264**, 11539-11542.
- THORPE, G.H.G., KRICKA, L.J. MOSELEY, S.B. & WHITEHEAD, T.P. (1985). Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitoring enzyme immunoassays. *Clin. Chem.* **31**, 1335-1341.
- TURNBULL, A., SMITH, G., LEE, S., VALE, W., LEE, K.F. & RIVIER, C. (1999). CRF type I receptor-deficient mice exhibit a pronounced pituitary-adrenal response to local inflammation. *Endocrinology* **140**, 1013-1017.
- VAN REETH, K., NAUWYNCK, H. & PENZAERT, M. (1998). Bronchoalveolar interferon-alpha, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and inflammation during acute influenza in pigs: a possible model for humans? *J. Infect. Dis.* **177**, 1076-1079.
- YAMASHITA, K., FUJINAGA, T., HAGIO, M., MIYAMOTO, T., IZUMISAWA, Y. & KOTANI, T. (1994). Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **56**, 103-107.

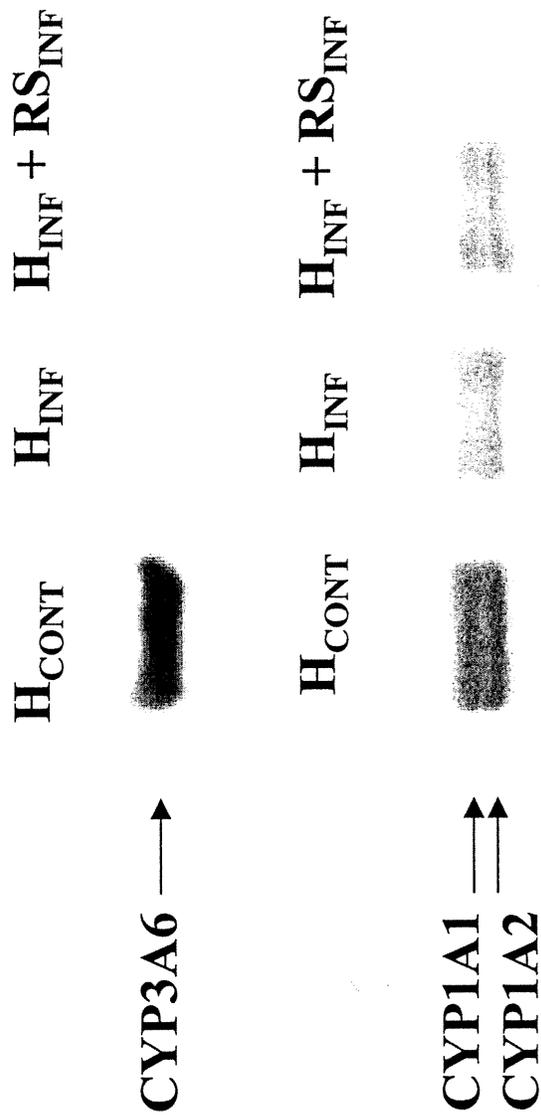


Figure 5.1 Effect of a turpentine-induced inflammatory reaction on the relative amounts of hepatic CYP1A1, 1A2, and 3A6 immunoreactive proteins in rabbits, 48 h after the s.c. injection of turpentine. H_{CONT} and H_{INF} are hepatocytes of control rabbits and rabbits with an inflammatory reaction, respectively.

Table 5.1 Effect of serum from rabbits and humans on the ability of the hepatocytes to biotransform theophylline.

	3MX ^a	1MU	1,3DMU
	(μg ml ⁻¹)		
H _{CONT} + RS _{CONT}	0.093 ± 0.026 ^b	0.079 ± 0.034	1.498 ± 0.419
H _{CONT} + HS _{CONT}	0.085 ± 0.008	0.086 ± 0.008	1.350 ± 0.255
H _{INF} + RS _{CONT}	0.011 ± 0.003 ^c	0.053 ± 0.006 ^c	0.710 ± 0.057 ^c
H _{INF} + RS _{INF}	0.008 ± 0.002	0.027 ± 0.006 ^d	0.527 ± 0.049 ^d
H _{INF} + HS _{CONT}	0.015 ± 0.004 ^e	0.052 ± 0.008 ^e	0.881 ± 0.106 ^e
H _{INF} + HS _{INF}	0.009 ± 0.004	0.030 ± 0.004 ^f	0.598 ± 0.068 ^f

Hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INF}) were incubated for 4 h with serum from control rabbits (RS_{CONT}) (n = 6), serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{INF}) (n = 6), serum from healthy volunteers (HS_{CONT}) (n = 6), and serum from humans with an respiratory tract viral infection (HS_{INF}) (n = 6) to assess the effect on the formation of theophylline metabolites.

^a 3 MX, 1MU and 1,3 DMU are 3-methylxanthine, 1-methyluric acid and 1,3-dimethyluric acid, respectively

^b data are mean ± s.e.m.

^c p<0.05 compared with H_{CONT} + RS_{CONT}

^d p<0.05 compared with H_{INF} + RS_{CONT}

^e p<0.05 compared with H_{CONT} + HS_{CONT}

^f p<0.05 compared with H_{INF} + HS_{INF}

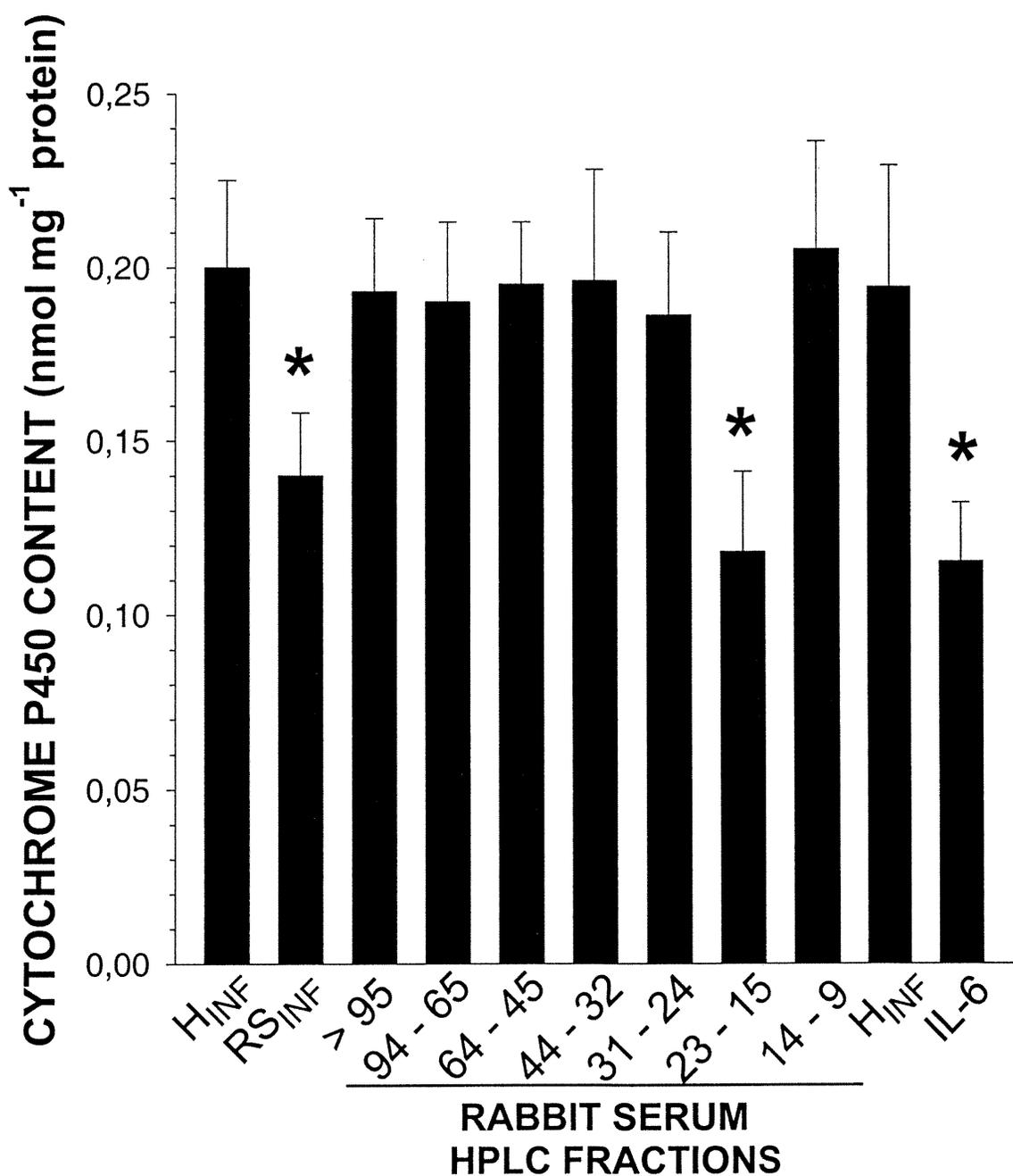


Figure 5.2 Effect of concentrated x1.25 HPLC fractions of serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{INF}) (n = 6) on cytochrome P450 content in hepatocytes of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INF}) following 4 h incubation. HPLC fractions are designated by the Mr of proteins contained in each fraction.

* p < 0.05 compared with P450 content in H_{INF}.

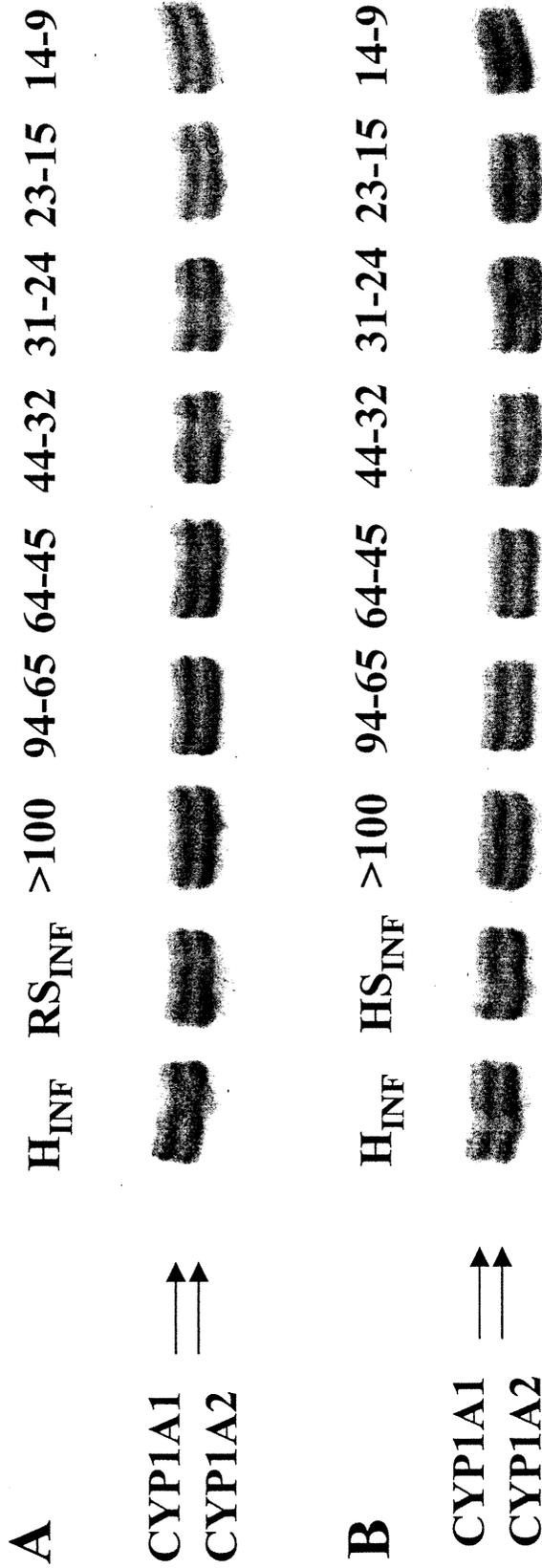


Figure 5.3 Effect of serum and concentrated HPLC fractions on the amount of CYP1A1 and 1A2 apoproteins of hepatocytes from a representative rabbit with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INF}). H_{INF} were incubated for 4 h in the presence of serum and concentrated (x1.25) HPLC fraction from turpentine-treated rabbit (RS_{INF}) (A), and of serum from one representative human with an upper respiratory tract viral infection and HPLC fraction (HS_{INF}) (B). HPLC fractions are designated by the Mr of proteins contained in each fraction.

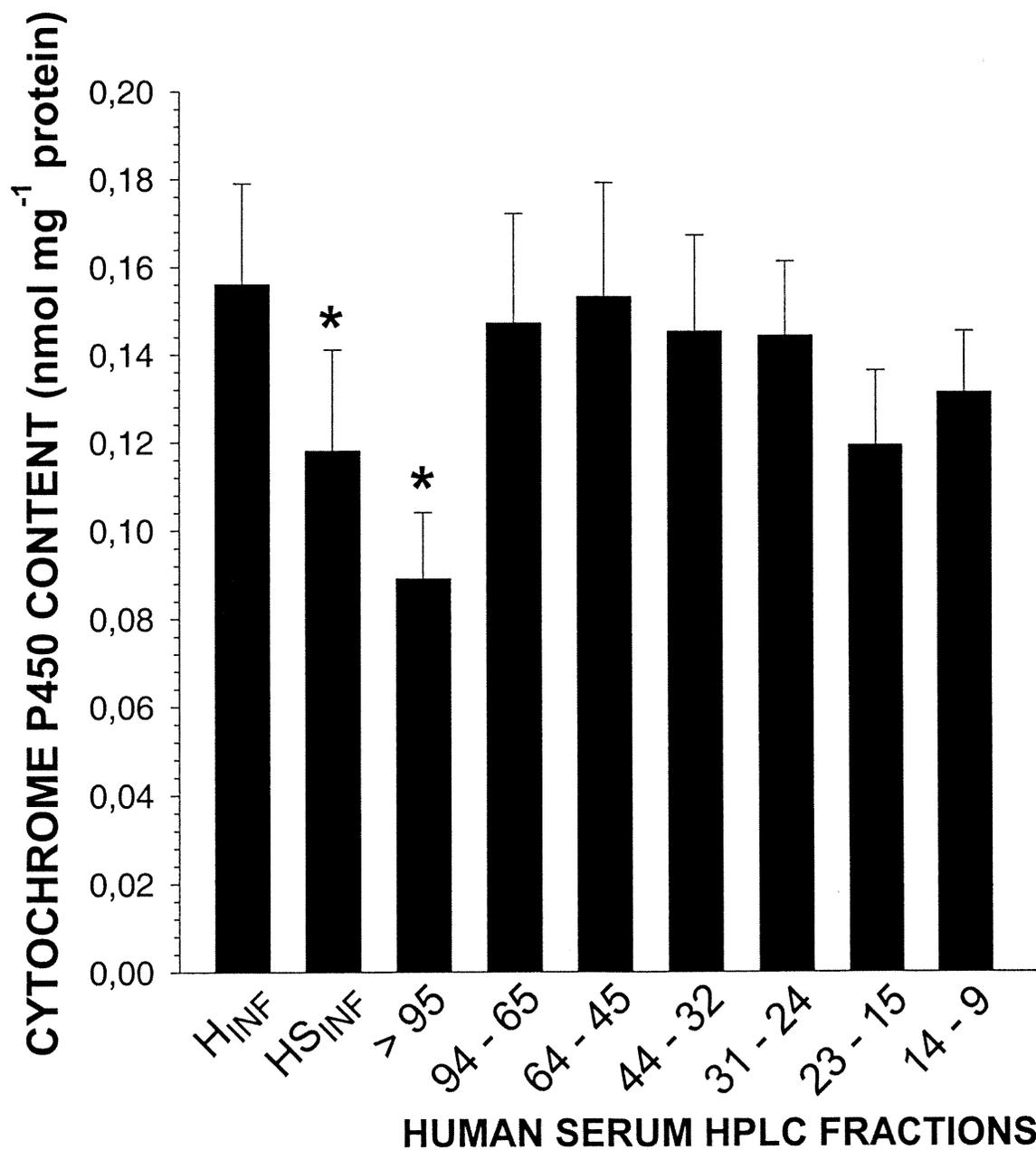


Figure 5.4 Effect of concentrated x1,25 HPLC fractions of serum from subjects with an upper respiratory tract viral infection (HS_{INF}) (n = 6) on cytochrome P450 content in hepatocytes of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INF}) following 4 h incubation. HPLC fractions are designated by the Mr of proteins contained in each fraction. * p<0.05 compared with P450 content in H_{INF}.

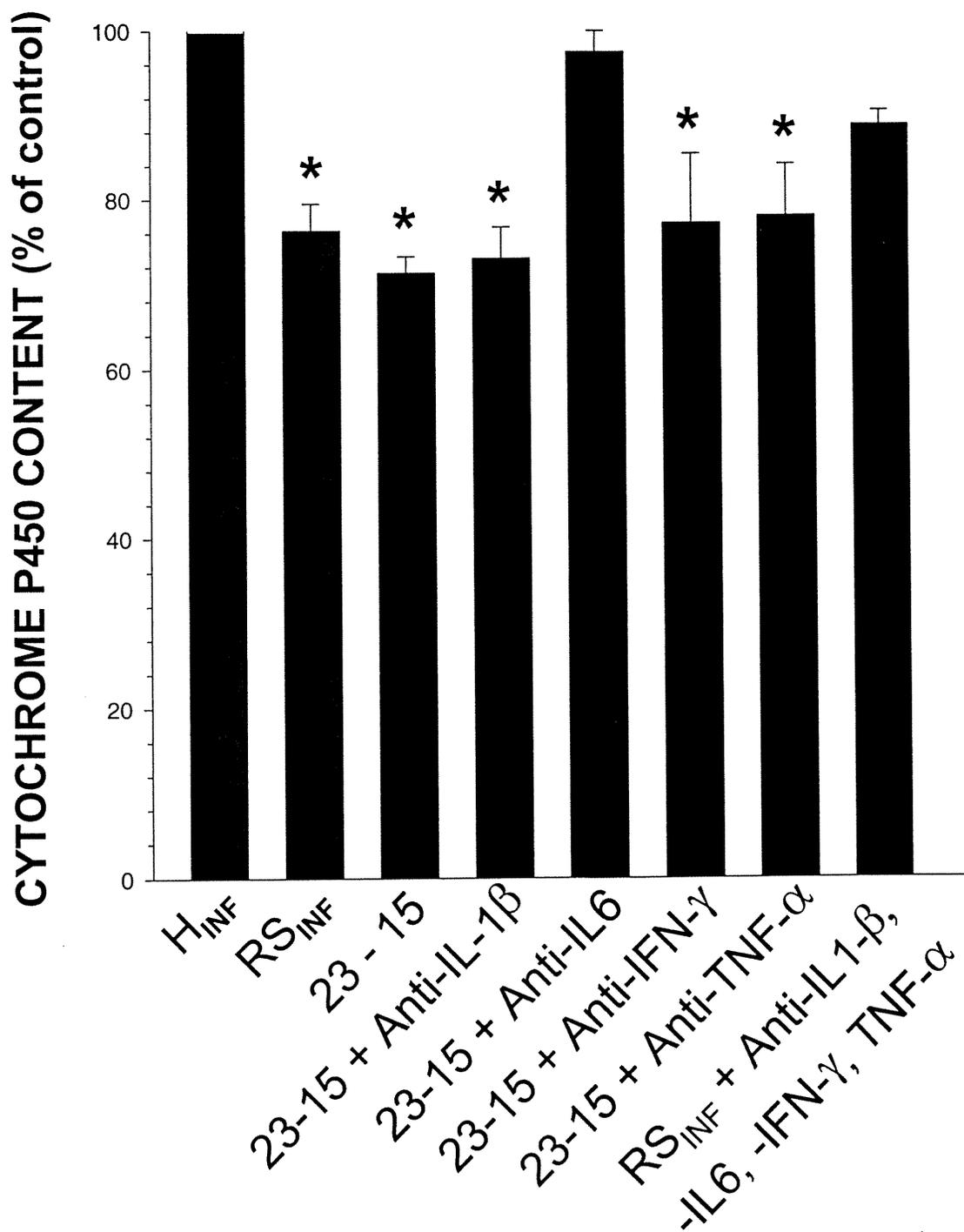


Figure 5.5 Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{INF}) (n = 7) and of the Mr 23-15 kDa HPLC fraction to reduce P450 content. H_{INF} are hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction. * p<0.05 compared with P450 content in H_{INF}.

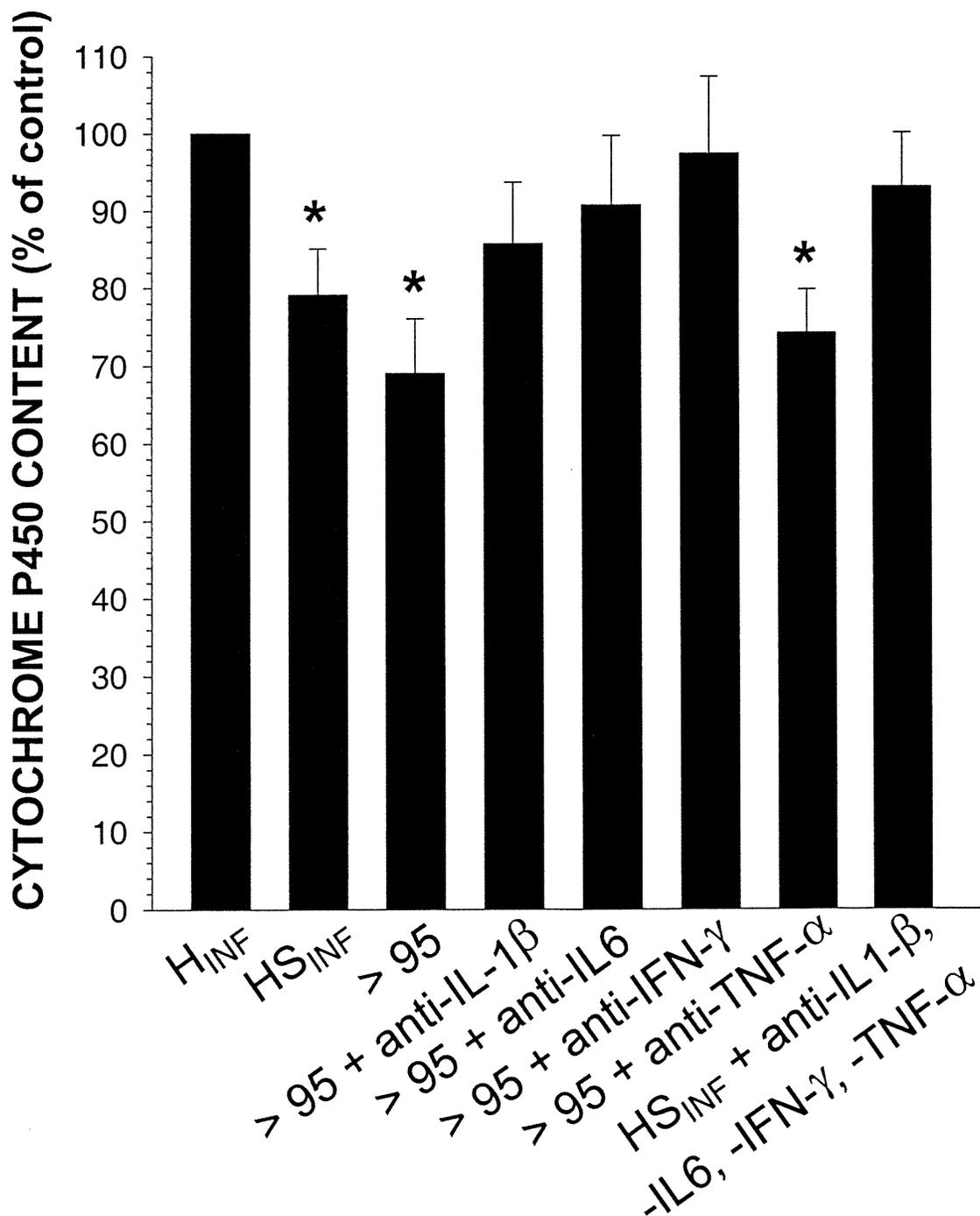


Figure 5.6 Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of serum from humans with an upper respiratory viral infection (HS_{INF}) (n = 8), and of the Mr >95 kDa HPLC fraction to reduce P450 content. H_{INF} are hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction. * p < 0.05 compared with P450 content in H_{INF}.

CHAPITRE 6

CYTOCHROME P450 DOWN-REGULATION BY SERUM FROM HUMANS WITH A VIRAL INFECTION AND FROM RABBITS WITH AN INFLAMMATORY REACTION¹

Anne-Marie Bleau, Caroline Fradette, Ayman O.S. El-Kadi, Marie-Claude Côté

and Patrick du Souich

Drug Metabolism and Disposition 29(7), 1007-1012, 2001.

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montréal, Montréal,
Québec, Canada

Abstract

Serum from humans with an upper respiratory viral infection (HS_{URVI}) and from rabbits with a turpentine-induced acute inflammatory reaction (RS_{TIAR}) reduce the activity of hepatic cytochrome P450 (P450) following 4 h of incubation. The aim of the present study was to assess the effect of HS_{URVI} and RS_{TIAR} on P450 activity and expression following 24 h of incubation with hepatocytes from control (H_{CONT}) and rabbits with a TIAR (H_{INFLA}). RS_{TIAR} incubated with H_{CONT} for 24 h reduced P450 content and activity, and CYP3A6 by 45%, without changing CYP1A1 and 1A2; when incubated with H_{INFLA}, RS_{TIAR} decreased P450 content and activity without affecting CYP1A1 or 1A2. HS_{URVI} incubated for 4 h with H_{CONT} decreased P450 activity without affecting the amounts of CYP1A1, 1A2 or 3A6, although when incubated for 24 h, P450 activity and CYP3A6 amount decreased. HS_{URVI} incubated with H_{INFLA} for 4 h reduced P450 content and activity, and incubated for 24 h reduced activity, P450 content, and amount of CYP1A1 and 1A2 proteins. The present study demonstrates that a) the effect of RS_{TIAR} and HS_{URVI} depends upon the susceptibility of the hepatocyte, i.e. H_{CONT} or primed H_{INFLA}, b) P450 down-regulation is preceded by a decrease in P450 activity, c) the nature of the inflammatory reaction determines the repercussions on P450 activity and expression, and d) CYP3A6 is more vulnerable than CYP1A1 and 1A2 to the down-regulation provoked by an inflammatory challenge.

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). As a consequence, bacterial and viral inflammatory reactions are cause of severe drug toxicity, essentially in pediatric and geriatric populations (Hendeles et al., 1977; Ziment, 1982; Koren and Greenwald, 1985). 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).

In response to viral infections, the concentration in blood of many cytokines is increased (Ramshaw et al., 1997). It has been assumed that *in vivo* cytokines are responsible for P450 depression because *in vitro* cytokines can depress multiple hepatic P450 isoforms and their mRNAs. For instance, INF- γ depresses CYP1A2, 2A6, 2B6 and 3A4, IL-6 depresses CYP1A1, 1A2, 2D, 3A4, and 4A1, and IL-1 β down-regulates 1A2, 2C11, 2D6, 2E1 and 3A (Donato et al., 1997; Fukuda et al., 1992; Parmentier et al., 1997; Trautwein et al., 1992). Furthermore, it has been reported that IFN- α (Stanley et al., 1991), IL-1 (Peterson and Renton, 1986) and TNF- α (Paton and Renton, 1998) can also reduce the activity of several P450 isoforms.

In vitro, following an incubation period of 4 h with hepatocytes, serum from humans with an upper respiratory tract viral infection (HS_{URVI}) and serum from rabbits with a turpentine-induced acute inflammatory reaction (RS_{TIAR}) decrease the activity of CYP1A1 and 1A2 without affecting the amount of these proteins (El-Kadi et al., 1997).

The mediators responsible for the decrease in P450 activity are IFN- γ , IL-6, and IL-1 β in HS_{URVI}, and IL-6 in RS_{TIAR} (Bleau et al., 2000), demonstrating that *in vivo*, infectious and non-infectious inflammatory reactions generate serum mediators, namely cytokines, capable to reduce P450 activity.

Since *in vivo*, an inflammatory reaction depresses the expression of multiple isoforms of the P450, it was of interest to establish whether HS_{URVI} and RS_{TIAR} are capable to down-regulate the expression of selected P450 isoforms in hepatocytes. Specifically, the aims of the present study were a) to assess the effect of RS_{TIAR} and HS_{URVI} on the activity and expression of hepatic CYP1A1, 1A2 and 3A6 following 24 h incubation periods, and b) to compare the differences in effect between RS_{TIAR} and HS_{URVI} as a function of the source of the hepatocytes, i.e. hepatocytes harvested from control rabbits (H_{CONT}) and hepatocytes from rabbits with a TIAR (H_{INFLA}). The use of H_{INFLA} was justified because the density of surface receptors to cytokines is greater than in H_{CONT} (Dinarello, 1994). Theophylline was used to assess the activity of some isoforms of the P450. In the rabbit, theophylline is primarily metabolized by CYP1A2 and CYP1A1, and to a minor degree by CYP3A6; CYP1A1 and CYP1A2 both contribute to the formation of theophylline three metabolites, 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) (Kurdi et al., 1999).

Abbreviations CYP, apoprotein of the cytochrome P450; 1,3DMU, 1,3-dimethyluric acid; H_{CONT}, hepatocytes from control rabbit; H_{INFLA}, hepatocytes from rabbit with a turpentine-induced acute inflammatory reaction; HS_{CONT} serum from control volunteers; HS_{URVI}, serum of human with an upper respiratory viral infection; IFN- γ ,

interferon- γ ; IL-, interleukin; L-NAME, N^o-nitro-L-arginine methyl ester; LPS, lipopolysaccharide; 1MU, 1-methyluric acid; 3MX, 3-methylxanthine; NOS, nitric oxide synthase; P450, cytochrome P450; RS_{CONT}, serum from control rabbits; RS_{TIAR}, serum from rabbits with a turpentine-induced acute inflammatory reaction; TIAR, turpentine-induced acute inflammatory reaction; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

Key words: cytochrome P450, inactivation, down-regulation, inflammation, turpentine, viral infection, hepatocytes, rabbits.

Materials and Methods

Collection of hepatocytes and serum from rabbits

Male New Zealand rabbits (1.8-2.2 kg) were obtained from Ferme Charles Rivers (St-Constant, Québec, Canada). A local inflammatory reaction was induced by the s.c. injection of 5 ml of turpentine (Recochem, Montréal, Québec) distributed into four distinct sites of the back of the rabbits. Forty-eight hours later, blood (20 ml) was withdrawn from the central artery of an ear of the rabbits, controls and with a TIAR; the rabbits were anesthetized, and hepatocytes were isolated. Blood samples were allowed to clot at room temperature for 2 h, centrifuged at 2500 r.p.m. for 5 min, and the serum was decanted and stored frozen at -20°C in 1 ml aliquots until use. The severity of the inflammatory reaction was assessed by measuring serum concentrations of seromucoids (Parent et al., 1992). All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of laboratory animals.

Hepatocytes were isolated according to the two step liver perfusion method of Seglen (1976), with minor modifications (El-Kadi et al., 1997). Viability was over 90% as assessed by trypan blue exclusion, and cell concentration was adjusted to $4 \times 10^6/\text{ml}$ with William's medium E (WME) supplemented with 10% calf serum. Aliquots of 2 ml of the hepatocytes, i.e. 8×10^6 cells, in suspension were transferred into each well of 12-well plastic culture plates (Falcon, Becton Dickinson Labware, Rutherford, NJ) coated with type I rat tail collagen and incubated with serum of control rabbits (RS_{CONT}) and RS_{TIAR} for 4 and 24 h at 37°C in an atmosphere of 95% $\text{O}_2/5\% \text{CO}_2$. Cell culture was conducted under sterile conditions.

Collection of serum from human

Blood (10 ml) was withdrawn from humans ($n = 8$) with an inflammatory reaction secondary to an upper respiratory viral infection, at the apex of clinical symptomatology, i.e. 24 h after the appearance of overt manifestations of an upper respiratory tract viral infection, such as rhinorrhea, sneezing, nasal congestion, sore throat, cough, and systemic signs of malaise including fever, in absence of purulent secretions. Blood samples were allowed to clot at room temperature for 2 h, centrifuged at 2500 r.p.m. for 5 min, and the serum was decanted and stored frozen at -20°C in 1 ml aliquots until use.

Five of the volunteers with an upper respiratory viral infection, once the blood sample was withdrawn to, took 300 mg of theophylline orally, and urine was collected for 24 h. At least 2 months later, in absence of any sign of infectious disease, a blood sample of 10 ml was withdrawn to the same 5 volunteers who afterwards received orally a second dose of 300 mg of theophylline, and urine was collected for 24 h. Serum from healthy (HS_{CONT}) and HS_{URVI} were incubated with H_{CONT} and H_{INFLA} and its effect on total P450 content and theophylline metabolism was assessed. Theophylline and its metabolites were assayed in the 24 h urine collections.

Cytochrome P450 content and activity

The efficacy of the serum to reduce hepatic P450 content was tested by incubating 200 μl of serum with 2 ml/well of H_{CONT} and H_{INFLA} for 4 and 24 h. Hepatic P450 content, evaluated by its ability to bind CO, was measured spectrophotometrically as described by Omura and Sato (1964). Protein content in hepatocytes was measured by the method of Lowry et al. (1951).

To assess the effect of serum on the activity of CYP1A1, 1A2, and 3A6 we determined the ability of P450 to metabolize theophylline by measuring the concentration of theophylline metabolites, 3MX, 1MU and 1,3DMU generated after 4 and 24 h of incubation (Kurdi et al., 1999). Theophylline was dissolved in serum-free WME, and 100 μ l were added to each well containing the hepatocytes to attain a final concentration of 176 μ M. After 4 and 24 h of incubation, an aliquot of the medium was collected and frozen at -20°C until analysis of theophylline and its metabolites by high performance liquid chromatography (du Souich et al., 1989).

Western Blot analysis

Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% polyacrylamide) under non-reducing conditions (Smith, 1994). Proteins were electrophoretically transferred to a nitro-cellulose membrane using a semidry transfer process (Bio-Rad, Hercules, CA). CYP1A1 and 1A2 proteins were detected with a polyclonal anti-rabbit CYP1A1, and visualized with an alkaline phosphatase conjugated secondary goat antibody using nitro blue tetrazolium as the substrate (Kruger, 1994). CYP3A6 protein was detected with a monoclonal anti-rat CYP3A1 and a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody; chemiluminescence was visualized by autoradiography (Thorpe et al., 1985). The intensities of the bands were measured with a software Un-Scan-It-Gel (Silk Scientific Inc., Orem, Utah).

Drugs and chemicals

The Percoll gradient, William's medium E, calf serum, type I rat tail collagen, NaCl, KCl, KH₂PO₄, HEPES, EGTA, glucose, theophylline, 3MX, 1MU and 1,3DMU were purchased from Sigma Chemicals (Sigma, St. Louis, MO) and insulin from Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim, Germany).

Statistical analysis

All data are reported as means \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 by Newman-Keuls post hoc test. The effect of RS_{TIAR} and HS_{URVI} on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 (densitometry values) was compared with the effect of RS_{CONT} and HS_{CONT} by using a paired t-test. The differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effect of a TIAR on P450 content, activity and amount of P450 apoproteins.

Total P450 content in H_{CONT} was 0.284 ± 0.014 nmol/mg of protein, value that was reduced to 0.152 ± 0.012 nmol/mg of protein in H_{INFLA} ($p < 0.05$). Compared with H_{CONT}, when theophylline was incubated for 4 h with H_{INFLA}, the formation of 1,3DMU, 3MX and 1MU was reduced by 43, 85 and 43%, respectively ($p < 0.005$), reflecting essentially a decrease in CYP1A1 and 1A2 activity (Table 6.1). After 24 h of incubation, the formation of 1,3DMU, 3MX and 1MU was reduced by a percentage similar to that reported after 4 h incubation (data not shown). Compared with H_{CONT}, the TIAR

diminished the amount of CYP1A1 by 47%, i.e. densitometry values were 391687 ± 41243 in H_{CONT} and 207492 ± 30617 in H_{INFLA} ($n = 3$, $p < 0.05$). CYP1A2 densitometry values were 309098 ± 57205 in H_{CONT} and 205618 ± 35456 in H_{INFLA} ($n = 3$, $p > 0.05$). The amount of CYP3A6 apoprotein was reduced to an undetectable level (Figure 6.1).

Effect of RS_{CONT} and RS_{TIAR} on P450 of H_{CONT} following 4 and 24 h of incubation.

Incubation of RS_{CONT} with H_{CONT} for 4 h did not modify P450 content and ability to biotransform theophylline ($n = 7$) (Table 6.1). Compared with RS_{CONT} , RS_{TIAR} did not modify P450 content, and did not reduce the formation of 3MX, 1MU and 1,3DMU ($p > 0.05$) (Table 6.1). Neither RS_{CONT} nor RS_{TIAR} affected the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in H_{CONT} (data not shown).

After a 24 h period of incubation with H_{CONT} , compared to RS_{CONT} , RS_{TIAR} did not modify P450 content, but reduced the formation of 1MU and 1,3DMU by 27 % and 28% respectively ($p < 0.05$, $n = 8$) (Table 6.1). Following 24 h of incubation with RS_{TIAR} , the amount of CYP1A1 and 1A2 remained unchanged, i.e. densitometry values for CYP1A1 were 283835 ± 17818 incubated with RS_{CONT} and 277457 ± 19912 with RS_{TIAR} , and for CYP1A2 densitometry values were 305303 ± 60486 with RS_{CONT} and 327771 ± 79745 with RS_{TIAR} . On the other hand, by reference to RS_{CONT} (densitometry value 492585 ± 98749), CYP3A6 decreased by 45% when H_{CONT} were incubated with RS_{TIAR} (284232 ± 68265) ($n = 4$, $p < 0.05$) (Figure 6.2).

Effect of RS_{CONT} and RS_{TIAR} on P450 of H_{INFLA} following 4 and 24 h of incubation.

Following 4 h of incubation, and compared with RS_{CONT}, RS_{TIAR} did not reduce P450 content in H_{INFLA}, but reduced the formation of 1MU and 1,3DMU by 34 % and 26 %, respectively ($P < 0.005$, $n = 7$) (Table 6.2). On the other hand, the amount of CYP1A1 and 1A2 proteins was not affected in H_{INFLA} (data not shown).

Following 24 h of incubation, RS_{TIAR} decreased P450 content by 36% (Table 6.2), and reduced the rate of formation of 3MX, 1MU, and 1,3DMU by 36%, 49%, and 36%, respectively ($p < 0.005$, $n = 7$) (Table 6.2). Following 24 h of incubation with RS_{TIAR}, the amount of CYP1A1 and 1A2 remained unchanged, i.e. densitometry values for CYP1A1 were 204011 ± 15778 incubated with RS_{CONT} and 201612 ± 19225 with RS_{TIAR}, and for CYP1A2 densitometry values were 218437 ± 27978 with RS_{CONT} and 228921 ± 40541 with RS_{TIAR} ($n = 4$). Since in H_{INFLA} the amount of 3A6 apoprotein was not measurable, it was not possible to assess the effect of RS_{TIAR} (data not shown). The percentage of reduction for each metabolite is greater at 24 h than at 4 h ($p < 0.05$).

In vivo effect of an URVI on the metabolism of theophylline in human volunteers

During the symptom-free period in 5 control volunteers, the 24 h urinary recovery of theophylline and its metabolites accounted for 69% of the dose administered, of which 13.3% was 3MX, 20.3% 1MU and 52.5% was 1,3DMU. While the volunteers presented symptoms of URVI, the 24 h urinary recovery of theophylline and its metabolites decreased to 58% ($p < 0.05$). Compared with the control period, recovery of 3MX, 1MU, and 1,3DMU was decreased by 30%, 29% and 14% ($p < 0.05$), respectively (Figure 6.3).

Effect of HS_{CONT} and HS_{URVI} on P450 of H_{CONT} following 4 and 24 h of incubation.

Incubation of HS_{CONT} with H_{CONT} for 4 and 24 h did not change hepatic P450. In contrast, following 4 h of incubation, HS_{URVI} did not modify total P450 content but decreased the formation of 1MU and 1,3DMU by 28 and 32% respectively ($p < 0.05$) (Table 6.3). The amounts of CYP1A1, 1A2 and 3A6 were not affected (data not shown).

Following 24 h incubation of H_{CONT} with HS_{URVI}, P450 content did not change, but the concentration of 3MX, 1MU, and 1,3DMU decreased by 27%, 38% and 36% ($p < 0.05$), respectively (Figure 6.4). Under these experimental conditions, incubation with HS_{URVI}, the amount of CYP1A1 and 1A2 remained unchanged, i.e. densitometry values for CYP1A1 were 234567 ± 19489 incubated with HS_{CONT} and 199592 ± 43628 with HS_{URVI}, and for CYP1A2 densitometry values were 297137 ± 45563 with HS_{CONT} and 258061 ± 53162 with HS_{URVI} ($n = 4$). The amount of CYP3A6 was reduced by 56 % from 453518 ± 134833 to 214747 ± 85175 ($n = 4$, $p < 0.05$) (Figure 6.4).

Effect of HS_{CONT} and HS_{URVI} on P450 of H_{INFLA} following 4 and 24 h of incubation.

Incubation of HS_{URVI} with H_{INFLA} for 4 h decreased total P450 content from 0.140 ± 0.013 nmol/mg of protein to 0.101 ± 0.011 nmol/mg of protein ($p < 0.05$). HS_{URVI} lowered the concentration of 1MU and 1,3DMU by 42 % and 32% respectively ($p < 0.05$) (Table 6.3), without affecting the amount of CYP1A1 and 1A2 (data not shown).

Incubation of HS_{URVI} with H_{INFLA} for 24 h decreased total P450 content from 0.135 ± 0.011 nmol/mg of protein to 0.079 ± 0.009 nmol/mg of protein ($p < 0.05$) ($n = 7$),

and lowered the concentration of 3MX, 1MU, and 1,3DMU by 40%, 55 % and 39% respectively ($p < 0.05$) ($n = 7$) (Table 6.3). Following incubation with HS_{URVI}, the amounts of CYP1A1 and 1A2 were reduced by 33% and 22% ($p < 0.05$), respectively, i.e. densitometry values for CYP1A1 were 193520 ± 12936 incubated with HS_{CONT} and 125503 ± 10377 with HS_{URVI}, and for CYP1A2 densitometry values were 188124 ± 17748 with HS_{CONT} and 141281 ± 10405 with HS_{URVI} ($n = 4$) (Figure 6.4).

Considering the 5 volunteers who received 300 mg of theophylline, incubation of HS_{URVI} with H_{INFLA} for 4 hours reduced theophylline biotransformation and in P450 content (data not shown), decrease that was not associated with the decrease in the 24 h urinary recovery of 3MX, 1MU and 1,3DMU (Figure 6.3). However, the *in vitro* reduction in P450 content was directly associated ($r^2 = 0.9101$) with the *in vivo* decrease in urinary recovery of the total amount of theophylline metabolites, i.e. 3MX + 1MU + 1,3DMU, supporting that the *in vivo* repercussions of a viral infection on drug metabolism are associated to the ability of the serum of these volunteers to reduce P450 activity.

Discussion

The present study demonstrates that RS_{TIAR} does not affect P450 amount or activity when incubated for 4 h with H_{CONT} , however it decreases P450 activity in H_{INFLA} . When RS_{TIAR} is incubated with H_{CONT} for 24 h, P450 activity is reduced, as well as the amount of CYP3A6 protein. Incubation of RS_{TIAR} with H_{INFLA} for 24 h decreases total P450 content and activity, without affecting CYP1A1 or 1A2. Keeping in mind that theophylline is primarily biotransformed by CYP1A2 (Kurdi et al., 1999), these results show that RS_{TIAR} elicits a dual effect on P450: it reduces the activity of CYP1A1 and 1A2, and down-regulates CYP3A6. RS_{TIAR} effects on P450 depend upon the time of incubation, and the state of the hepatocytes, i.e. control or primed.

The RS_{TIAR} -induced decrease in P450 activity could be a general phenomenon since the down-regulation of P450 isoforms by lipopolysaccharides is preceded by their inactivation (Sewer et al., 1998). Nitric oxide may have a pivotal role in P450 inactivation by both, the turpentine induced inflammation (El-Kadi et al., 2000), and lipopolysaccharides-induced endotoxemia (Sewer et al., 1998; Takemura et al., 1999). The fact that the biotransformation of theophylline and total P450 content in H_{INFLA} are reduced by RS_{TIAR} without changes in the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 proteins, further supports that nitric oxide contributes to the reduction in P450 activity. As discussed, upon binding to Fe^{2+} and Fe^{3+} -heme, nitric oxide impedes O_2 binding and as a consequence, it reduces theophylline biotransformation. In parallel, nitric oxide binding to Fe^{2+} -heme impedes the binding of carbon monoxide used for the spectrophotometric determination of total P450 content (Omura and Sato, 1964), resulting in the apparent decrease in total P450 content.

Following 24 h incubation with H_{CONT} , RS_{TIAR} reduction of P450 activity and CYP3A6 expression may be explained by the fact that IL-6 is the primary serum mediator induced by the TIAR (Bleau et al., 2000; Siewert et al., 2000). IL-6 preferentially depresses activity and expression of CYP3A, with little effect on the expression of CYP1A1 and 1A2 proteins (Muntané-Relat et al., 1995). CYP3A6 down-regulation by IL-6 has been associated with the decrease in the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor mRNAs (Pascussi et al., 2000). On the other hand, it has been shown that IL-6 increases the expression of inducible nitric oxide synthase (NOS2) (Ma and Zhu, 2000). Since CYP3A6 in H_{INFLA} is already depressed by the TIAR, incubation of H_{INFLA} with RS_{TIAR} for 24 h reduces only CYP1A1 and 1A2 activity.

When HS_{URVI} is incubated for 4 h with H_{CONT} , there is a decrease in P450 activity without changes in CYP1A1, 1A2 or 3A6 apoproteins; when the incubation is prolonged for 24 h, the decrease in P450 activity is accompanied by a reduction in the amount of CYP3A6. Incubation of HS_{URVI} with H_{INFLA} for 4 h reduces activity and total P450 content, and incubation for 24 h reduces activity, total P450 content and amount of CYP1A1 and 1A2 proteins. These experiments clearly indicate that P450 down-regulation is preceded by a decrease in activity of several P450 isoforms. As demonstrated by the *in vivo* studies in human volunteers, the potency of the HS_{URVI} to reduce P450 activity is directly associated with the repercussions of the viral infection on the *in vivo* metabolism of theophylline.

There is evidence pointing out that following the incubation of HS_{URVI} with H_{CONT} and H_{INFLA} for 4 h, the decrease in P450 activity is also mediated by nitric oxide (El-Kadi et al., 2000). The decrease in P450 activity in H_{CONT} following 4 h incubation with HS_{URVI} implies that the source of nitric oxide may not be NOS2, since longer periods are

required to increase its expression. A potential source of nitric oxide in H_{CONT} could be CYP3A6, since this isoform is a direct source of nitric oxide (Servent et al., 1989; Boucher et al., 1992). On the other hand, in H_{INFLA} after 4 h of incubation, the effect of HS_{URVI} is almost totally prevented by L-NAME (El-Kadi et al., 2000), supporting that nitric oxide is also responsible for the decrease in P450 activity. The source of nitric oxide in H_{INFLA} could be NOS2, because CYP3A6 is almost completely down-regulated.

Following 24 h of incubation, HS_{URVI} down-regulates CYP1A1/2 in H_{INFLA} but not in H_{CONT} , where only CYP3A6 is down-regulated. Possibly several factors associated to the density of surface receptors, the kind of cytokines stimulated by influenza, and the ability of these cytokines to depress selective P450 isoforms contribute to explain these differences. In H_{INFLA} primed by the TIAR, the density of surface receptors to IFN- γ , IL-1 β , TNF- α and IL-6 could be increased, since not only inflammatory stimuli increase the density of surface receptors but also higher levels of circulating cytokines produce the same effect (Dinarello, 1994; Volpes et al., 1991). In humans, influenza increases the concentration of cytokines known to down-regulate P450 isoforms, such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IFN- γ (Han and Meydani, 2000). The ability of these cytokines to depress CYP3A isoforms is greater than that to down-regulate CYP1A1/2 (Abdel-Razzak et al., 1993; Muntané-Relat et al., 1995). These differences may be explained in part by the mechanism through which a cytokine depresses the expression of an isoform. For example, IL-1 β promotes a pre-transcriptional repression, while IFN- γ exerts a post-transcriptional suppressive effect on CYP3A6 expression (Calleja et al., 1998), and a pre-transcriptional down-regulation of CYP1A2 (Abdel-Razzak et al., 1993), however its effect is weak compared to IL-1 β (Calleja et al., 1997). IL-6 is a stronger pre-transcriptional repressor of CYP3A4 mRNA than IL-1 β and TNF- α , but TNF- α appears

to elicit a stronger pre-transcriptional effect on CYP1A1/2 than IL-1 β and IL-6 (Muntané-Relat et al., 1995). We may postulate that CYP3A6 expression is more sensitive to the effect of cytokines because IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IFN- γ down-regulate CYP3A6 expression through pre- and post-transcriptional mechanisms, and CYP1A1/2 only by a pre-transcriptional repression mechanism.

In conclusion, the present study demonstrates a) that the effect of RS_{TIAR} and HS_{URVI} depends upon the susceptibility of the hepatocyte (H_{CONT} or primed H_{INFLA}), emphasizing the importance of the model for an accurate interpretation of the results, b) that P450 down-regulation is preceded by a decrease in P450 activity, c) that the differences between RS_{TIAR} and HS_{URVI} are primarily dependent upon the mediators contained in the serum, indicating that the nature of the inflammatory reaction is of importance to determine the repercussions on P450 activity and expression, and d) the present results confirm that CYP3A6 is more vulnerable than CYP1A1 and 1A2 to the down-regulation provoked by an inflammatory challenge, a fact that may have practical consequences when it is taken into account the relevancy of this isoform in drug metabolism.

References

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

- Boucher JL, Genet A, Vadon S, Delaforge M, Henry Y and Mansuy D (1992) Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N omega-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Commun* **187**:880-886.
- Calleja C, Eckhoutte C, Dacasto M, Larrieu G, Dupuy J, Pineau T and Galtier P (1998) Comparative effects of cytokines on constitutive and inducible expression of the gene encoding for the cytochrome P450 3A6 isoenzyme in cultured rabbit hepatocytes: consequences on progesterone 6beta-hydroxylation. *Biochem Pharmacol* **56**:1279-1285.
- Calleja C, Eckhoutte C, Larrieu G, Dupuy J, Pineau T and Galtier P (1997) Differential effects of interleukin-1 beta, interleukin-2, and interferon-gamma on the inducible expression of CYP 1A1 and CYP 1A2 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **239**:273-278.
- Cuzzocrea S, Sautebin L, De Sarro G, Costantino G, Rombola L, Mazzon E, Ialenti A, De Sarro A, Ciliberto G, Di Rosa M, Caputi AP and Thiemermann C (1999) Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *J Immunol* **163**:5094-5104.
- Dinarello CA (1994) The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* **8**:1314-1325.
- Donato MT, Guillen MI, Jover R, Castell JV and Gomez-Lechon MJ (1997) Nitric oxide-mediated inhibition of cytochrome P450 by interferon- γ in human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **281**, 484-490.
- 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 patient with GOLD with and without hypoxemia. *Chest* **95**:1028-1032.

- El-Kadi AOS and du Souich P (1998) Down-regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: characterization of the nature of mediators in rabbit serum, and in the liver. *Life Sci* **63**:1361-1370.
- 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.
- Fukuda Y, Ishida N, Noguchi T, Kappas A and Sassa S (1992) Interleukin-6 down regulates the expression of transcripts encoding cytochrome P450 IA1, IA2 and IIIA3 in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **184**:960-9655.
- Han SN and Meydani SN (2000) Antioxidants, cytokines, and influenza infection in aged mice and elderly humans. *J Infect Dis* **182** (Suppl 1):S74-S80.
- Hendeles L, Bighley L, Richardson RH, Hepler DD and Carmichael J (1977) Frequent toxicity from IV aminophylline infusions in critically ill patients. *Drug Int Clin Pharmacol* **11**:2-18.
- Koren G and Greenwald M (1985) Decreased theophylline clearance causing toxicity in children during viral epidemics. *J Asthma* **22**:75-79.
- Kurdi J, Maurice H, El-Kadi AO, Ong H, Dalkara S, Bélanger PM, 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.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.
- Ma TC and Zhu XZ (2000) Neurotoxic effects of interleukin-6 and sodium nitroprusside on cultured rat hippocampal neurons. *Arzneimittelforschung* **50**:512-514
- Morgan ET (1997) Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* **29**:1129-1188.
- Muntané-Relat J, Ourlin JC, Domergue J and Maurel P (1995) Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* **22**:1143-53
- Omura T and Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.1. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* **239**:2370-2378.
- 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.
- Parmentier JH, Schohn H, Bronner M, Ferrari L, Batt AM, Dauca M and Kremers P (1997) Regulation of CYP4A1 and peroxisome proliferator-activated alpha expression by interleukine-1beta, interleukine-6, and dexamethasone in cultured fetal hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **54**:889-898.
- 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.
- Paton TE and Renton KW (1998) Cytokine-mediated down-regulation of CYP1A1 in Hepal cells. *Biochem. Pharmacol* **55**:1791-1796.

- Peterson TC and Renton KW (1986) The role of lymphocytes, macrophages and interferon in the depression of drug metabolism by dextran sulfate. *Immunopharmacol* **11**:21-28.
- Ramshaw IA, Ramsay AJ, Karupiah G, Rolph MS, Mahalingan S and Ruby JC (1997) Cytokines and immunity to viral infectious. *Immunol Rev* **159**:119-135.
- Servent D, Delaforge M, Ducrocq C, Mansuy D and Lenfant M (1989) Nitric oxide formation during microsomal hepatic denitration of glyceryl trinitrate: involvement of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* **163**:1210-1216.
- Seglen PO (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* **13**:29-83.
- Sewer MB, Barclay TB and Morgan ET (1998) Down-regulation of cytochrome P450 mRNAs and proteins in mice lacking a functional NOS2 gene. *Mol Pharmacol* **54**:273-9
- Siewert E, Bort R, Kluge R, Heinrich PC, Castell J and Jover R (2000) Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent. *Hepatology* **32**: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.
- Stanley LA, Adams DJ, Balkwill FR, Griffin D and Wolf CR (1991) Differential effects of recombinant interferon alpha on constitutive and inducible cytochrome P450 isozymes in mouse liver. *Biochem Pharmacol* **42**:311-20.
- Takemura S, Minamiyama Y, Imaoka S, Funae Y, Hirohashi K, Inoue M and Kinoshita H (1999) Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J Hepatol* **30**:1035-44.
- 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.

Trautwein C, Ramadori G, Gerken G, Meyer Zum Buschenfelde KH and Manns M (1992) Regulation of cytochrome P450 IID by acute phase mediators in C3H/HeJ mice. *Biochem Biophys Res Comm* **182**:617-623.

Volpes R, van den Oord JJ, De Vos R, Depla E, De Ley M and Desmet VJ (1991) Expression of interferon-gamma receptor in normal and pathological human liver tissue. *J Hepatol* **12**:195-202.

Ziment I (1982) Management of respiratory problems in the aged. *J Am Geriatr Soc* **30** (Suppl):S36-44.

Table 6.1 Effect of serum from rabbits with an inflammatory reaction on P450 content and ability to biotransform theophylline incubated for 4 and 24 h with hepatocytes from control rabbits.

	Cytochrome P450 (nmol/mg protein)	3MX ($\mu\text{g/mL}$)	1MU ($\mu\text{g/mL}$)	1,3DMU ($\mu\text{g/mL}$)
<u>4 h incubation</u>				
H _{CONT} + NaCl	0.284 \pm 0.014	0.084 \pm 0.012	0.091 \pm 0.013	1,404 \pm 0,186
H _{INFLA} + NaCl	0.152 \pm 0.012*	0.013 \pm 0.013*	0.052 \pm 0.005*	0,796 \pm 0.062*
<u>4 h incubation</u>				
H _{CONT} + RS _{CONT}	0.299 \pm 0.021	0.091 \pm 0.022	0.096 \pm 0.024	1.390 \pm 0.400
H _{CONT} + RS _{TIAR}	0.280 \pm 0.023	0.071 \pm 0.021	0.073 \pm 0.014	1.170 \pm 0.338
<u>24 h incubation</u>				
H _{CONT} + RS _{CONT}	0.198 \pm 0.009	0.246 \pm 0.024	0.153 \pm 0.025	5.050 \pm 0.434
H _{CONT} + RS _{TIAR}	0.179 \pm 0.014	0.180 \pm 0.020	0.112 \pm 0.027 [¶]	3.620 \pm 0.333 [¶]

Hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) (n = 8) and hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INFLA}) (n = 8) were incubated with NaCl 0.9% for 4 hr or with serum from control rabbits (RS_{CONT}) and serum from rabbits with an inflammatory reaction (RS_{TIAR}) (n = 8) for 4 and 24 h. 3MX, 1MU and 1,3 DMU are 3-methylxanthine, 1-methyluric acid and 1,3-dimethyluric acid, respectively. Data are means \pm s.e. *p<0.05 H_{INFLA} compared with H_{CONT}, [¶] p<0.05 RS_{TIAR} compared with RS_{CONT}.

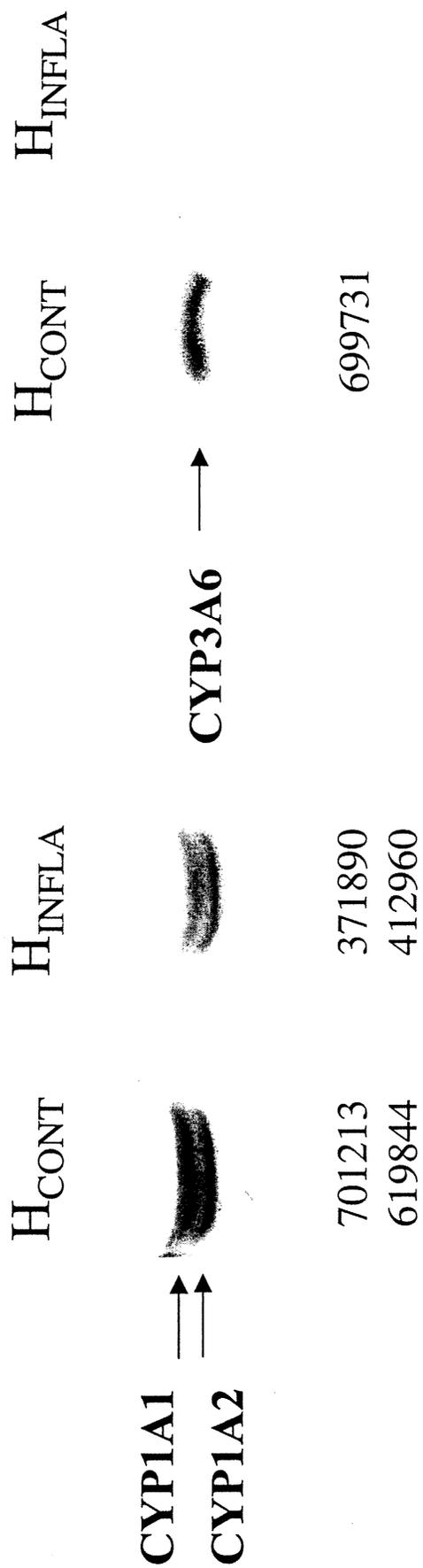


Figure 6.1 Effect of a turpentine-induced inflammatory reaction on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from control (H_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INFLA}), 48 h after the injection of turpentine. Numbers indicate densitometry values.

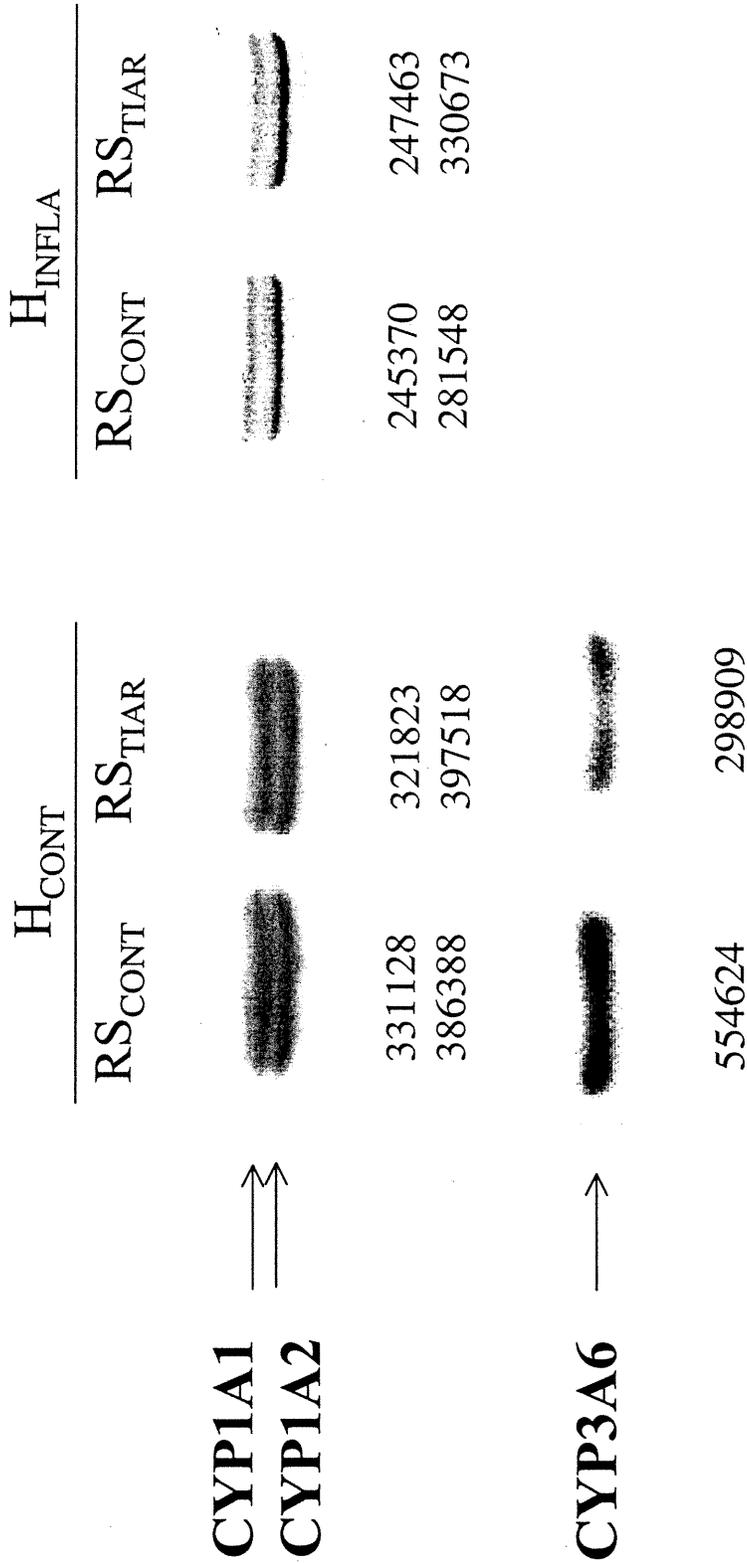


Figure 6.2 Effect of serum from control (RS_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{INFLA}) on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INFLA}), after a 24 h period of incubation. Numbers indicate densitometry values.

Table 6.2 Effect of serum from rabbits with an inflammatory reaction on P450 content and ability to biotransform theophylline incubated for 4 and 24 h with hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction.

	Cytochrome P450 (nmol/mg protein)	3MX ($\mu\text{g/mL}$)	1MU ($\mu\text{g/mL}$)	1,3DMU ($\mu\text{g/mL}$)
<u>4 h incubation</u>				
$H_{\text{INFLA}} + \text{RS}_{\text{CONT}}$	0.164 ± 0.021	0.011 ± 0.003	0.053 ± 0.005	0.710 ± 0.057
$H_{\text{INFLA}} + \text{RS}_{\text{TIAR}}$	0.125 ± 0.021	0.008 ± 0.002	$0.035 \pm 0.003^*$	$0.527 \pm 0.049^*$
<u>24 h incubation</u>				
$H_{\text{INFLA}} + \text{RS}_{\text{CONT}}$	0.135 ± 0.014	0.069 ± 0.007	0.079 ± 0.012	2.000 ± 0.187
$H_{\text{INFLA}} + \text{RS}_{\text{TIAR}}$	$0.086 \pm 0.007^*$	$0.044 \pm 0.007^*$	$0.040 \pm 0.010^*$	$1.280 \pm 0.202^*$

Hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INFLA}) ($n = 7$) were incubated with serum from control rabbits (RS_{CONT}), and serum from rabbits with an inflammatory reaction (RS_{TIAR}) ($n = 7$) for 4 and 24 h. 3MX, 1MU and 1,3 DMU are 3-methylxanthine, 1-methyluric acid and 1,3-dimethyluric acid, respectively. Data are means \pm s.e. * $P < 0.05$ compared with $H_{\text{INFLA}} + \text{RS}_{\text{CONT}}$.

Table 6.3 Effect of serum from control subjects (HS_{CONT}) and volunteers with an upper respiratory tract viral infection reaction (HS_{SURVI}) on the ability of hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INFLA}) to biotransform theophylline after a 4 and 24 h period of incubation.

	3MX ($\mu\text{g/ml}$)	1MU ($\mu\text{g/ml}$)	1,3DMU ($\mu\text{g/ml}$)
<u>4 h incubation</u>			
H _{CONT} + HS _{CONT}	0.075 \pm 0.006	0.082 \pm 0.007	1.350 \pm 0.131
H _{CONT} + HS _{SURVI}	0.058 \pm 0.007	0.058 \pm 0.008*	0.918 \pm 0.144*
H _{INFLA} + HS _{CONT}	0.015 \pm 0.004	0.051 \pm 0.008	0.881 \pm 0.106
H _{INFLA} + HS _{SURVI}	0.008 \pm 0.003	0.029 \pm 0.003 [¶]	0.598 \pm 0.068 [¶]
<u>24 h incubation</u>			
H _{CONT} + HS _{CONT}	0.177 \pm 0.016	0.960 \pm 0.010	3.550 \pm 0.401
H _{CONT} + HS _{SURVI}	0.130 \pm 0.013*	0.060 \pm 0.008*	2.260 \pm 0.432*
H _{INFLA} + HS _{CONT}	0.058 \pm 0.003	0.076 \pm 0.009	2.100 \pm 0.211
H _{INFLA} + HS _{SURVI}	0.035 \pm 0.005 [¶]	0.034 \pm 0.009 [¶]	1.290 \pm 0.210 [¶]

3MX is 3-methylxanthine, 1MU is 1-methyluric acid, and 1,3DMU is 1,3-dimethyluric acid. Vertical bars are SEM. Results are mean \pm s.e.. *, [¶] p<0.05 compared to H_{CONT} + HS_{CONT} and H_{INFLA} + HS_{CONT}, respectively.

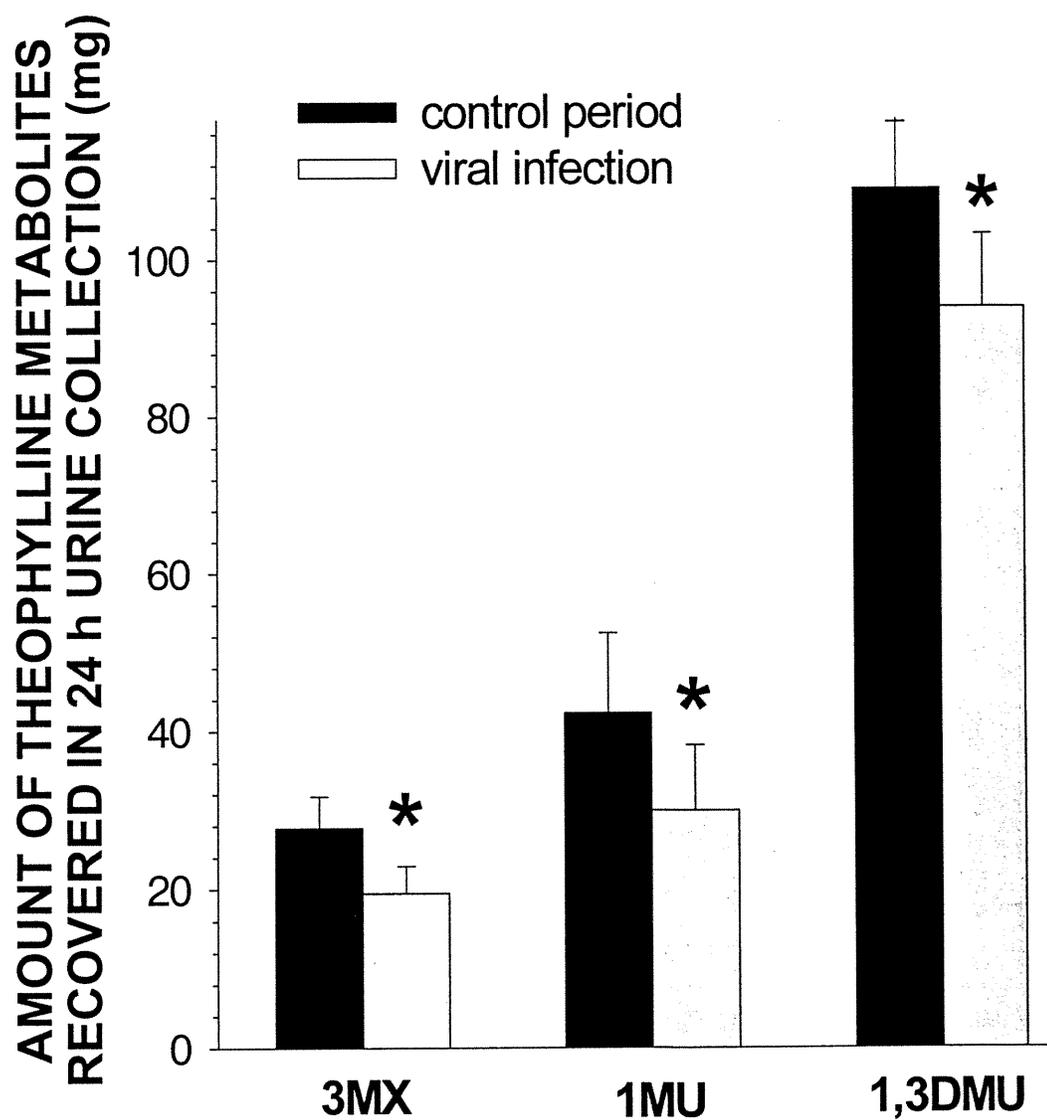


Figure 6.3 Amount of 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) recovered in a 24 h urinary collection from 5 volunteers with and without an upper respiratory viral infection after oral intake of 300 mg of theophylline.



Figure 6.4 Effect of serum from volunteers with (HS_{URVI}) and without (HS_{CONT}) an upper respiratory tract viral infection reaction on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{INFLA}), after a 24 h period of incubation. Numbers indicate densitometry values.

CHAPITRE 7

MODULATION OF CYP1A1, 1A2 AND 3A6 EXPRESSION BY SERUM MEDIATORS RELEASED DURING A VIRAL INFECTION AND A TURPENTINE-INDUCED INFLAMMATION

Anne-Marie Bleau¹, Patrick Maurel², Vincent Pichette³, François Leblond³
and Patrick du Souich¹.

¹ Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada

² INSERM U128, Montpellier, France

³ Service de Néphrologie et Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-
Rosemont, Université de Montréal, Montréal, Québec Canada

Abstract

Inflammation reduces the activity and expression of hepatic cytochrome P450, affecting the metabolism of a wide variety of endogenous compounds and xenobiotics, with consequences on drug activity and toxicity. This study aimed to identify the serum mediators responsible for the down-regulation of cytochrome P450 (P450) isoforms during a viral infection in humans and in a model of aseptic inflammation. Incubation for 48 h of rabbit hepatocytes with serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction or with serum from humans with an upper respiratory viral infection decreased mRNA levels and amounts of corresponding CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins. Fractionation of serum proteins by size exclusion chromatography revealed that proteins with Mr ranging from 15 to 31 kDa are responsible for P450 down-regulation. Immuno-neutralization of candidate cytokines showed that during an aseptic inflammation, interleukin-6 (IL-6) and to a lesser degree IL-1 β , are involved in the down-regulation of all three isoforms. In serum from humans with a viral infection, IL-1 β , IL-6, interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis-factor- α (TNF- α) contribute to the down-regulation of P450 isoforms. CYP1A1 and 1A2 seem to be regulated by serum mediators at the transcriptional level while CYP3A6 appears to be under the control of pre and post-transcriptional mechanisms.

Abbreviations H_{CONT}: hepatocytes from control rabbits; HPLC: high performance liquid chromatography; HS_{CONT}: serum from healthy volunteers; HS_{URVI}: serum from humans with an upper respiratory viral infection; IFN- γ : interferon- γ ; IL-1 β : interleukin-1 β ; IL-2: interleukin-2; IL-6: interleukin-6; Mr: relative molecular mass; P450: cytochrome P450; RS_{CONT}: serum from control rabbits; RS_{TIIR}: serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction; TIIR: turpentine-induced inflammatory reaction; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; URVI: upper respiratory viral infection

Keywords: cytochrome P450, inflammation, down-regulation, serum mediators, cytokines

Introduction

Inflammation and infection can have a profound impact on hepatic drug metabolism. It has been known for more than three decades that activation of host-defense responses causes the release of cytokines responsible for the depression of P450 enzymes.¹ This phenomenon is of utmost importance since P450 monooxygenases play a crucial role in the metabolism of a variety of endogenous and exogenous compounds. Many conditions can influence the expression of P450, which in turn can affect the rate of drug biotransformation and lead to undesirable drug plasma and tissue concentrations, with consequences on therapeutic effect and toxicity.² In this respect, diseases represent a major source of variability in drug response, with the impact of acute and chronic inflammatory reactions being among the best studied.³

In animal models, stimulation of the acute phase response by immunostimulants such as viruses, bacteria, endotoxins, turpentine and interferon decrease the activity and amount of P450.¹ Early studies suggested that the reduction in P450 expression is mediated by cytokines. *In vivo*, recombinant cytokines such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) diminish P450-mediated drug metabolism, and down-regulate selective P450 isoforms. *In vitro* these cytokines depress CYP1A1/A2, 2C11, 2E1 and CYP3A family.⁴⁻⁶ The use of knockout mice supports that IL-6 has an important role in the turpentine-induced P450 down-regulation, but not in the LPS model.⁷ In a viral infection, other cytokines, like IFN- γ , play a critical role in P450 down-regulation.⁸

It has been shown that incubation of rabbit hepatocytes for 4 h with serum from humans (HS) with an upper respiratory viral infection (URVI) or serum from rabbits (RS) with a turpentine-induced inflammatory reaction (TIIR) decrease P450 activity without

affecting the expression of P450 isoforms.⁹ The decrease in P450 activity by rabbit serum is almost totally dependent upon IL-6; in contrast, in human serum, IFN- γ , IL-1 β and IL-6 contribute to the *in vitro* reduction of P450 activity.¹⁰

Incubation of RS_{TIR} and HS_{URVI} with hepatocytes for 24 and 48 h down-regulate several isoforms of P450. The present study aimed to determine the nature of the mediators in HS_{URVI} and in RS_{TIR} that down-regulate P450 isoforms. To this purpose, we investigated the effect of human and rabbit serum on *CYP1A1/1A2* and *3A6* mRNA levels and amounts of the corresponding apoproteins after 24 and 48 h of incubation with hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}). Serum proteins were fractionated by size exclusion high-performance liquid chromatography and tested for their effect on P450. Immunoneutralization of candidate cytokines was used to identify the mediators involved. In RS_{TIR}, IL-6 and to a lesser degree IL-1 β , are involved in the down-regulation of all three isoforms. In HS_{URVI}, IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α contribute to the down-regulation of P450 isoforms. The present study emphasizes that multiple serum mediators with overlapping functions contribute to down-regulate P450 isoforms and that the mediators depend upon the kind of inflammatory reaction.

Materials and methods

Hepatocyte isolation and culture conditions.

Livers from male New Zealand rabbits (2-2.2 kg) obtained from Ferme Charles Rivers (St-Constant, Quebec, Canada) were perfused *in situ* with collagenase using the two step liver perfusion method described by Seglen¹¹, with minor modifications.⁹ Harvested cells were centrifuged on isodensity Percoll to isolate viable liver cells (90%

viability as assessed by trypan blue exclusion). Hepatocytes (3×10^6 in 3 ml of William's medium E supplemented with 10% calf serum) were plated in 12-well plastic culture plates (Falcon, Becton Dickinson Labware, Rutherford, NJ) coated with type I rat tail collagen. Cell culture was conducted under sterile conditions and maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air. The medium was changed 2 hours after plating (prior to the addition of serum or HPLC fractions), and cells were incubated for 24 and 48 hr. At the end of the incubation period, liver cells were washed in 3 ml of PBS and flash-frozen into liquid nitrogen. Samples were kept at -80°C until analysis. All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of laboratory animals.

Preparation of rabbit and human serum

A local inflammatory reaction was induced by the s.c. injection of 5 ml of turpentine (Recochem, Montréal, Québec) distributed into four distinct sites of the back of the rabbits. Forty-eight hours later, blood (20 ml) was withdrawn from the central artery of an ear of the animals. Human blood (10 ml) was withdrawn from volunteers, either healthy ($n = 7$) or presenting an inflammatory reaction secondary to an upper respiratory viral infection ($n = 7$), at the apex of clinical symptomatology, i.e. 24-48 h after the onset of clinical symptomatology (fever, rhinorrhea, sneezing, nasal congestion, sore throat, cough and systemic signs of malaise). Blood samples were allowed to clot at room temperature for 2 h, centrifuged at 2500 r.p.m. for 5 min, and the serum was decanted and stored frozen at -80°C in 1 ml aliquots until use.

Aliquots of 200 µl of serum from control (RS_{CONT}) and RS_{THR}, as well as serum from healthy volunteers (HS_{CONT}) and HS_{URVI} were incubated for 24 and 48 h with

H_{CONT}, and the effect on P450 was assessed by measuring CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A6 apoproteins and the mRNA coding for these isoforms.

Fractionation of serum proteins

To characterize the proteins in serum responsible for the down-regulation of P450 isoforms, the serum was fractionated according to the Mr of the proteins by size exclusion high-performance liquid chromatography (HPLC) on a Superose 12 HR column from Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, Qc., Canada). Column pressure was maintained between 8 and 10 bar, flow rate was set at 0.3 ml/min with a LKB 2150 HPLC pump (Bromma, Sweden) and absorbance was measured at 280 nm with a Waters 490E spectrophotometric detector (Millipore, Milford, MA). The eluent buffer contained 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM HEPES, 25 mM EGTA and 5.5 mM glucose; this solution was adjusted to pH 7.4 and filtered through a 0.22 µm membrane. To calculate the Mr of the serum proteins contained in each HPLC fraction, a calibration curve was established by injecting 300 µl of buffer containing a mixture of six standard proteins (100 µg/ml): L-glutamic dehydrogenase (55.6 kDa), aldolase (39.2 kDa), triosephosphate isomerase (26.6 kDa), trypsin inhibitor (26.6 kDa), cytochrome c (12.5 kDa) and aprotinin (6.5 kDa). Serum aliquots of 300 µl were injected into the column and fractions of 1.2 ml were collected with a fraction collector (LKB 2211 Superrac). The fractions recovered corresponded to proteins with Mr included in the range of 9 to 14, 15 to 23, 24 to 31, 32 to 44, 45 to 64, and 65 to 94 kDa. Since the column could not separate proteins in the high Mr region, the proteins contained in the first fraction were designated as Mr >95 kDa.

In order to increase sensitivity, collected fractions were concentrated on Microsep 3K membranes (Pall Filtron, Northborough, MA), which retain proteins of more than 3 kDa: this provided protein concentrations equivalent to those in whole serum.

Immuno-neutralization of cytokines

In serum fractions, the proteins decreasing CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A6 were identified by immuno-neutralization. One polyclonal and four monoclonal antibodies against cytokines were used to neutralize P450 down-regulation induced by serum and HPLC fractions. To immuno-neutralize mediators in rabbit serum, the following antibodies were used: a goat anti-rabbit interleukin-1 β (anti-rbIL-1 β antibody), monoclonal antibodies against human interleukin-6 (anti-IL-6) and human interferon- γ (anti-IFN- γ), and a sheep anti-human tumor necrosis factor- α (anti-TNF- α). The three antibodies against human cytokines were used to neutralize the homologous rabbit cytokines because of the known cross-reactivity of these antibodies.¹²⁻¹⁴ The same antibodies against human cytokines as well as a monoclonal anti-human interleukin-1 β (anti-hIL-1 β antibody) were used to neutralize mediators in human serum and fractions. An irrelevant monoclonal antibody (IgG to *Pseudomonas aeruginosa*) served as control. Aliquots of 2 μ g of each antibody were added to 200 μ l of the HPLC fractions able to down-regulate P450, and pre-incubated at 37°C for 1 h. The combination of the four antibodies was incubated only with HS_{URVI} and RS_{TIR}. Antibody-treated sera or HPLC fractions were added to H_{CONT} at the beginning of the incubation period.

To confirm the ability of cytokines to down-regulate P450 isoforms, recombinant human IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ (2.5 to 10 ng/ml) were incubated for 48 h with H_{CONT}.

Measurement of cytokines in serum

IFN- γ was measured by a sandwich solid-phase RIA using anti-IFN- γ mAb (clone 42.25) to coat the solid phase and ^{125}I -labeled anti-IFN- γ mAb (clone KM48) as detecting probe. TNF- α was assessed using a sandwich ELISA using mouse mAb to human TNF- α (clone T144.B) and a polyclonal rabbit anti-TNF- α . These measurements were performed in duplicate by the laboratory of Dr. G. Delespesse and Dr. M. Sarfati as previously describe, sensitivity was 30 pg ml^{-1} for IFN- γ and 45 pg ml^{-1} for TNF- α ¹¹. IL-6 and IL-1 β were measured using ELISA kits purchased from PharMingen (San Diego, CA).

Measurement of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins

Protein content in hepatocytes was measured by the method of Lowry et al.¹⁶ and aliquots of $4 \mu\text{g}$ of proteins were electrophoresed on 7.5% polyacrylamide gels under non-reducing conditions. Separated proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane using a semi-dry transfer process (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.). Bands were immunologically detected using a polyclonal anti-rabbit CYP1A1-1A2 (Oxford Biochemical Research, Oxford, MI, U.S.A.) diluted 1:100 in 5% nonfat milk in TBS/0.1% Tween 20 and visualized with an alkaline phosphatase conjugated secondary goat antibody using nitro blue tetrazolium as the substrate.¹⁷ CYP3A6 protein was detected with a monoclonal anti-rat CYP3A1 (Oxford Biochemical Research, Oxford, MI, U.S.A.) diluted to 1:100 with 5% nonfat milk in TBS/0.1% Tween 20 using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Chemiluminescence was visualized by autoradiography¹⁸ and band intensities were measured with a software Un-

Scan-It-Gel (Silk Scientific Inc., Orem, Utah). Data are presented in arbitrary units as the ratio of the densitometric values of the bands for each sample over that of the control.

Preparation of cDNA probes

The complete cDNA sequences for rabbit CYP1A1 and 1A2 (corresponding to pLM-6 and pLM-4 gene respectively) were available as inserts in pUC19, cloned in the *Lac Z* region between the EcoRI (396 pb) and PstI (440 pb) sites. The cDNA sequence for CYP3A6 (p-4.1 gene) was an insert in pBR322, cloned at the Pst-1 site (3609 pb). A small cDNA fragment for CYP1A1 was isolated by the digestion of the recombinant plasmid with the enzymes Pst-1 and Not-I which generated a 261 pb fragment. Similarly, a 329 bp fragment for CYP1A2 was generated by digestion of the construct with Pst-1 and Sac-I; and the 324 pb-fragment for CYP3A6 was excised using Sal-I and Cla-I. The fragments were purified using the NucleoTrap extraction kit (Clontech, Palo Alto, CA) and inserted into the pBluescriptII plasmid (Stratagene, La Jolla, CA) containing sites for RNA polymerase (for T7 and T3 promoters). The plasmids were first dephosphorylated with alkaline phosphatase and ligated to the DNA fragment using a T4 DNA ligase (Life Technologies, Rockville, MD). Bacteria (*E. coli*) were transfected with the constructs by heat shock and seeded on petri dishes containing LB culture medium without ampicillin. The transfected bacteria were incubated overnight in 5 ml of LB medium containing ampicillin with vigorous agitation. The recombinant clones were analyzed by the Miniprep method and digestion with restriction enzymes to generate the needed fragments.

The three cDNA probes were sequenced in both directions by the Sanger method using the Sequenase 2.0 kit (United States Biochemicals, Cleveland, OH). Sp6 and T7 primers

were used and the cDNA fragments were sequenced twice. The results of sequencing demonstrated 100% identity of each fragment with its sequence in Genbank.

Northern blot analysis

Total RNA was isolated using 1 ml of TRIZOL Reagent (Life Technologies Inc., Rockville, MD) per $5-10 \times 10^6$ cells. RNA concentration was measured spectrophotometrically at the absorbance of 260 nm (with an $A_{260/280}$ ratio ≈ 2). Total RNA samples were denatured by heating at 60°C for 10 min in buffer containing 42% deionized formamide, 30 mM 4-morpholinepropanesulfonic acid and 8.5% formaldehyde. Thirty μ g of RNA were then separated by electrophoresis in a denaturing 1% agarose-1.7% formaldehyde gel submerged in a buffer containing 20 mM 4-morpholinepropanesulfonic acid, 8 mM sodium acetate and 1 mM EDTA, pH 7.2. Isolated RNA was transferred to a nylon membrane (Qiabrane, Qiagen) by capillary blotting with a solution of 1.2 M NaCl and 0.15 M sodium citrate, pH 7.0. RNA was fixed to the membrane by exposure to UV light. Membranes were prehybridized for 30 min at 42°C using the ULTRAhyb hybridization buffer (Amicon, Austin, TX, USA). The cDNA probes for CYP1A1-A2-3A6 and 18S were labeled with [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech) using Klenow fragment according to the oligo-priming method of the Oligolabelling kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ). Hybridization was performed at 42°C for 24 h with the radiolabelled cDNA probe and the blots washed as recommended by the manufacturer. Membranes were subjected to autoradiography film Biomax with Biomax TranScreen-HE intensifying screens (Kodak) at -80°C during 24 h. Data are presented as the ratio of the densitometric value of the isoforms of the P450 over that of the 18S.

Two forms of CYP3A6 mRNA are expressed in rabbit liver, one with 1.85-kb and the other with 1.7-kb. These forms differ by the length of their 3' untranslated region, and code for the same protein.¹⁹ Both forms were separated and quantified simultaneously.

Drugs and chemicals

The Percoll gradient, William's medium E, calf serum, type I rat tail collagen, NaCl, KCl, KH₂PO₄, HEPES, EGTA and glucose were purchased from Sigma Chemicals (Sigma, St. Louis, MO), insulin from Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim, Germany), and L-glutamic dehydrogenase, aldolase, triosephosphate isomerase, trypsin inhibitor, cytochrome c and aprotinine from Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, Qc., Canada). The polyclonal anti-rabbit CYP1A1 and the monoclonal anti-rat CYP3A1 was obtained from Oxford Biochemical Research (Oxford, MI), the goat anti-rabbit IL-1 β from Cedar Lane (Hornby, ON, Canada), the monoclonal antibodies against human IL-6 and human IFN- γ from R&D Systems (Minneapolis, MN). The sheep anti-human TNF- α antibody was graciously given by Protherics Inc.

Statistical analysis

All data are reported as means \pm s.e. Comparisons between two treatments were carried out using a paired t-test and between treatment groups using one-way test of ANOVA followed by Newman-Keuls *post hoc* test. The differences were considered statistically significant when the probability was $p < 0.05$.

Results

In vivo effect of the TIIR on hepatic P450 apoproteins and mRNAs.

Compared with the amount of apoproteins in H_{CONT}, 48 h after the induction of the TIIR, the amount of CYP1A1 was reduced by 54%, that of CYP1A2 by 46%, and that of CYP3A6 to almost undetectable levels ($p < 0.05$) ($n = 3$). Concomitant to the down-regulation of the apoproteins, the mRNAs encoding for CYP1A1 and CYP1A2 were reduced by 63% and 66%, respectively; in addition, the two forms of *CYP3A6* mRNA were diminished by 62% and 63% ($p < 0.05$) ($n = 3$). (Figure 7.1).

Effect of RS_{TIIR} and HPLC fractions on P450 expression in H_{CONT}.

Amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins

Incubation of RS_{CONT} and the corresponding HPLC fractions with H_{CONT} did not change the expression of P450 isoforms. Addition of RS_{TIIR} to H_{CONT} for 24 h did not modify the amount of CYP1A1 and CYP1A2 apoproteins; however, it decreased CYP3A6 by 20% ($p < 0.05$) ($n = 6$) (data not shown). When the incubation was prolonged to 48 h, CYP1A1 was reduced by 26%, CYP1A2 by 25% and CYP3A6 by 27% ($p < 0.05$) ($n = 7$) (Figure 7.2).

Incubation of the 24-31 and 15-23 kDa HPLC fractions with H_{CONT} for 24 h reduced CYP3A6 apoprotein by 32% and 19%, respectively (data not shown). When the same two HPLC fractions were incubated with H_{CONT} for 48 h, CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A6 were decreased by 20 to 40% ($p < 0.05$) ($n = 4$) (Figures 7.3 to 7.5). The other HPLC fractions did not affect the expression of these apoproteins.

Amount of mRNAs encoding for CYP1A1, 1A2 and 3A6

Compared to RS_{CONT}, incubation of H_{CONT} with RS_{TIR} for 24 h did not modify the levels of mRNAs for any of the three isoforms of P450 tested. However, after 48 h of incubation, RS_{TIR} down-regulated the mRNAs for CYP1A1 by 42%, CYP1A2 by 38%, and the two forms of *CYP3A6* mRNAs by 39% and 35% ($p < 0.05$) ($n = 6$) (Figure 7.2).

Like the whole serum, 24 h incubation of H_{CONT} with individual HPLC fractions did not change the amounts of mRNAs for any of the three isoforms. When the incubation was prolonged to 48 h, the fraction containing proteins with a Mr of 15-23 kDa tended ($p > 0.05$) to diminish *CYP1A1* and *CYP1A2* mRNAs by 28% and 35%, respectively ($n = 3$); a similar trend was observed with the 24-31 kDa fraction, which tended to reduce *CYP1A1* and *CYP1A2* mRNAs by 60% and 47%, respectively ($p > 0.05$) ($n = 3$) (Figures 7.3 and 7.4). The 15-23 and 24-31 kDa HPLC fractions tended to diminish the levels of the two forms of *CYP3A6* mRNAs by 42 to 58% ($p > 0.05$) ($n = 3$) (Figure 7.5).

Identification of the mediators in RS_{TIR} responsible for the down-regulation of P450 isoforms.

The previous results indicate that the effect of RS_{TIR} results from the effect elicited by the mediators in fractions 15-23 and 24-31 kDa, therefore these two fractions were combined for immuno-neutralization experiments. Compared with RS_{CONT}, incubation of H_{CONT} with RS_{TIR} and the 15-31 kDa fraction for 48h reduced CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins by approximately 25% ($p < 0.05$) ($n = 4$) (Figure 7.6). The effect of the 15-31 kDa fraction on CYP1A1 was partially prevented by anti-IL-6 antibody. The down-regulation of CYP1A2 and 3A6 by the 15-31 kDa fraction was hindered by anti-

IL-1 β and anti-IL-6 antibodies (Figure 7.6). Anti-IFN- γ and anti-TNF- α antibodies did not reverse the effect of the 15-31 kDa fraction on any of the apoproteins. When all four antibodies were added to RS_{TIR} and incubated with H_{CONT}, the extent of the protection elicited was greater than with each antibody added alone to the 15-31 kDa fraction (Figure 7.6).

Effect of HS_{URVI} and HPLC fractions on P450 expression in H_{CONT}

Amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins

Incubation of H_{CONT} with HS_{CONT} and its HPLC fractions did not modify P450 expression (data not shown). After 24 h of incubation, compared with HS_{CONT}, HS_{URVI} reduced the amount of CYP3A6 by 24%. Incubation of H_{CONT} with HS_{URVI} and the 15-23 kDa fraction for 48 h diminished the amount CYP1A1 by 24% and 28% ($p < 0.05$), and that of CYP1A2 by 29% and 33% ($p < 0.05$), respectively ($n = 7$ for serum, and $n = 4$ for HPLC fractions) (Figures 7.7 and 7.8). After 48 h of incubation, HS_{URVI} and the 15–23 kDa fraction reduced the expression of CYP3A6 by 38% and 43%, respectively ($p < 0.05$) (Figure 7.9).

Amount of mRNAs encoding for CYP1A1, 1A2 and 3A6

Compared with HS_{CONT}, incubation of HS_{URVI} with H_{CONT} down-regulated *CYP1A1* mRNA by 33% at 24 h, and by 56% at 48 h ($p < 0.05$) ($n = 6$). Of the HPLC fractions tested, the 15-23 kDa fraction incubated with H_{CONT} for 24 h down-regulated *CYP1A1* mRNA by 35% (data not shown). When the incubation was prolonged to 48 h, the 15-23 kDa fraction repressed *CYP1A1* mRNA by 58 % ($p < 0.05$) ($n = 3$) (Figure 7.7).

HS_{URVI} down-regulated *CYP1A2* mRNA by 32% and 58% after 24 h and 48 h of incubation with H_{CONT}, respectively ($p < 0.05$) ($n = 6$). While the HPLC fractions of

HS_{URVI} did not elicit a clear down-regulation of *CYP1A2* mRNA after 24 h incubation, following 48 h incubation, the 15-23 kDa and 24-31 kDa fractions down-regulated *CYP1A2* mRNA by 60% and 56%, respectively ($p < 0.05$) ($n = 3$) (Figure 7.8).

Incubation of HS_{URVI} with H_{CONT} for 24 h repressed the two forms of *CYP3A6* mRNA by 32% and 20%; at 48 h, the decreases reached 33% and 45% ($p < 0.05$) ($n = 6$). After 48 h incubation of H_{CONT} with the 15-23 kDa fraction of HS_{URVI}, the values of the 1.7 or the 1.8 kb bands of *CYP3A6* mRNA were not significantly different from control ($n = 3$), and that due to the large inter-individual variability in effect of each fraction.

Identification of the mediators in HS_{URVI} responsible for the down-regulation of P450.

Compared to HS_{CONT}, the addition HS_{URVI} and the 15-31 kDa fraction to H_{CONT} reduced in 48h CYP1A1, CYP1A2 or 3A6 apoproteins by 25 to 37% ($p < 0.05$) (Figure 7.10). Pre-incubation of the 15-31 kDa fraction with anti-TNF- α and anti-IFN- γ antibodies partially prevented the down-regulation of CYP1A1. Anti-IL-6, anti-IFN- γ and anti-TNF- α partly hindered the diminution in expression of CYP1A2. All four antibodies when incubated with the 15-31 kDa fraction prevented to some extent the decrease in CYP3A6 apoprotein. The mixture of the four antibodies added at the same time to HS_{URVI} totally impeded the decrease in the amount of CYP1A1, CYP1A2 or 3A6 apoproteins, i.e. the amounts were equal to those observed in H_{CONT} incubated with HS_{CONT} (Figure 7.10).

Presence of cytokines in human serum and repressive effect of recombinant human cytokines.

In HS_{CONT}, cytokines concentrations were below the detection limit of the methods used. Five HS_{URVI} were screened for the presence of cytokines. IL-6 was detectable in all serums, with a mean concentration of 8.6 ± 1.6 pg/ml. Although IL-1 β was not detectable, IFN- γ as well as TNF- α concentrations were above the detectable value of the assay in two individual serum, with concentrations of 75 and 48 pg/ml, respectively.

After 48 h of incubation with H_{CONT}, recombinant human cytokines (IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α) down-regulated CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoprotein, the effect being maximum at 10 ng/ml, with decreases ranging from 15 to 35%. The combination of the four cytokines (5 ng/ml each cytokine) produced a greater reduction than any individual cytokine incubated alone (n = 2). A representative gel for IL-6 is shown in figure 7.11.

Discussion

This study demonstrates that sera from rabbits with an aseptic inflammatory reaction contain mediators capable to down-regulate CYP1A1, 1A2 and 3A6 and to repress the mRNAs encoding for these apoproteins. The mediators involved are IL-6 and IL-1 β . On the other hand, sera from humans with an upper respiratory viral infection down-regulate the apoproteins and the mRNAs encoding for CYP1A1, 1A2 and 3A6 by means of IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α .

The inflammatory response at the site of turpentine injection is initiated by the release of IL-1 β and TNF- α from mast cells and macrophages, cytokines that stimulate

the release of IL-6 from stromal and other cells.²⁰⁻²² The significance of the effect of IL-1 β and IL-6 on the liver during an inflammatory reaction is illustrated by the fact that in mice with targeted deletions of IL-6 and IL-1 β genes, the changes in expression of acute phase proteins, fever and anorexia in response to a TIIR are abolished.²³⁻²⁶ Moreover, reduction in mRNA amounts encoding for CYP1A2, CYP2A5, and CYP3A11 during a TIIR is abrogated in IL-6-deficient mice, confirming that IL-6 is an indispensable mediator for the down-regulation of hepatic P450 isoforms during aseptic inflammation.⁷ The present results demonstrate that in the TIIR, both IL-6 and IL-1 β are serum mediators contributing to the down-regulation of hepatic CYP1A1, 1A2 and 3A6.

Previous studies in our laboratory have shown that incubation of RS_{TIIR} with H_{TIIR} for 4 h reduces the amount and activity of P450, and IL-6 accounts for the decrease.¹⁰ The differences in serum mediators required to reduce the activity and to down-regulate P450 could be explained by two mechanisms not mutually exclusive. Firstly, considering the mechanism of action, the decrease in P450 activity appears associated to an increased presence of reactive oxygen intermediates that affect the apoprotein,²⁷ while down-regulation is exerted at the mRNA level.¹ Secondly, the decrease in P450 activity is apparent only in primed hepatocytes, i.e. hepatocytes harvested from rabbits with a TIIR.²⁸ This may be explained by the fact that IL-6 can increase the level of its own receptor IL-6R making the hepatocytes more responsive to the cytokine.²⁹ Moreover, the decrease in activity by IL-6 requires nitric oxide, and enhanced production of nitric oxide will only be observed in primed hepatocytes to allow for the expression of inducible nitric oxide synthase.²⁷

The mediators responsible for the down-regulation triggered by HS_{URVI} show a certain degree of specificity concerning the isozymes affected. IFN- γ and TNF- α mediate the down-regulation of CYP1A1 and CYP1A2; in addition, IL-6 is also involved in the

suppression of CYP1A2. The decrease in expression of both apoproteins might be associated to a reduction in the expression of their mRNAs, i.e. secondary to a pre-translational mechanism. In the case of CYP3A6, its down-regulation results from the action of IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α . The inability to detect IL-1 β in the serum from humans with URVI does not deter a role for IL-1 β since there is evidence that extremely small variations in IL-1 β plasma concentrations may be enough to trigger an effect. Effectively, during a TIIR, small and transient increases in the concentration of IL-1 β are found in the serum of 30% of animals.^{30,31} While low to undetectable levels of IL-1 β are found in TIIR, this cytokine can elicit its effects at extremely low concentrations, at the fM to nM.³² The mechanism of action underlying the decrease in expression of CYP3A6 is more difficult to ascertain since the sera from volunteers with an upper respiratory viral infection reduced *CYP3A6* mRNA, while the corresponding HPLC fractions did not produce statistically significant changes. The reason being that the 15-31 kDa fraction from two of the serums tended to increase *CYP3A6* mRNA, while the third sample decreased it. Since IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α individually have the ability to down-regulate *CYP3A6* mRNA, we may speculate that the combination of mediators in HS_{URVI} at very low concentrations modulates *CYP3A6* mRNA differently. Alternatively, HS_{URVI} also contains substances able to induce the expression of *CYP3A6* mRNA, i.e. increase in plasma cortisol triggered by the infectious stress.³³ To conciliate these apparently contradictory results, i.e. decrease in the expression of the apoprotein in some cases dissociated from the change in mRNA, it must be taken into account that CYP3A6 expression can be depressed by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. It has been shown that IFN- γ reduces CYP3A expression without affecting *CYP3A* mRNAs.⁴ Moreover, it has been proposed that the down-regulation of CYP3A6 by IL-1 β and IL-2 occurs by promoting a transcriptional repression mechanism, whereas IFN- γ acts

through a post-transcriptional mechanism, mainly by inhibiting *CYP3A6* mRNAs translation.³⁴

The importance of the implication of several cytokines, in addition to IL-6, in the decrease of P450 in subjects with an URVI can be derived from experiments in IL-6 deficient mice infected with influenza virus. While the lack of IL-6 prevents symptoms of sickness produced by turpentine injection, these symptoms are only slightly modified during influenza virus infection in IL-6 deficient mice, indicating that IL-6 is less critical during influenza infection.³⁵ In H_{CONT} , rhIL-6 concentrations in the order of the ng/ml were required to decrease CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A6 apoproteins. In contrast, average concentration of IL-6 in the serum of subjects with an URVI was 8.6 ± 1.6 pg/ml. This approximately one thousand fold concentration difference required to depress P450 expression cannot simply be explained on the basis of lower biological activity of the recombinant protein. The additive and/or synergistic effect of several cytokines, including IL-6, is a likely possibility, as supported by the fact that, firstly, the addition of the four recombinant human cytokines to hepatocytes produces a decrease in CYP3A6 greater than that originated by IL-6 alone; and secondly, the neutralization of all cytokines is required to revert totally the effect of serum. It is interesting to note that incubation of HS_{URVI} with H_{TIR} for 4 h decreases P450 activity, effect primarily due to IFN- γ with a smaller contribution of IL-6 and IL-1 β ¹⁰ and none from TNF- α , emphasizing that not all the mediators implicated in P450 down-regulation are required to reduce P450 activity.

The present study emphasizes how the nature of an inflammatory reaction influences the repressor effect of a given cytokine. For example, IL-1 β contributed to the down-regulation of CYP1A2 and CYP3A6 by RS_{TIR} , however in HS_{URVI} , IL-1 β appears to modulate the expression of only CYP3A6. IL-6 is a mediator in RS_{TIR} contributing to down-regulate CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A6, whereas IL-6 in HS_{URVI} regulates

CYP1A2 and CYP3A6. Finally, in RS_{TIIR} INF- γ and TNF- α did not affect any of these isoforms but affected all three of them in HS_{URVI} (Table 1). Probably several mechanisms underlie these differences, such as the number of cytokines released, the concentrations of these cytokines, the cross-talk between cytokine signaling pathways and the modulation of a cytokine's effect by another cytokine.³⁶ Concerning IFN- γ and TNF- α , the differences between RS_{TIIR} and HS_{URVI} may be associated with the plasma concentration of these cytokines, since in the TIIR, TNF- α and IFN- γ are not detectable in serum.⁷ The effectiveness of an individual cytokine to down-regulate selected P450 isoforms contrasts with the effect of RS_{TIIR} and HS_{URVI} where several cytokines at rather low concentrations are present. For instance, in human hepatocytes, it has been reported that IL-1 β is the strongest depressor of CYP1A2 and CYP3A4, and that INF- γ has a negligible effect on CYP3A4; moreover, IL-6 ability to depress CYP1A2 and 3A4 is similar to that of TNF α .⁴ In rabbit hepatocytes, IL-1 β does not affect CYP3A6 although INF- γ decreases it by around 45%.³⁴ In mouse liver, IFN- α does not down-regulate CYP1A1, although it reduces CYP1A2,³⁷ and in the rat, polyinosinic acid-polycytidylic acid, a potent stimulator of IFN- α/β , does not modify constitutive CYP1A1.³⁸

In conclusion, an aseptic inflammatory reaction and a viral infection of the upper respiratory tract trigger the release of cytokines in serum which are responsible for the down-regulation of CYP1A1, 1A2 and 3A6, probably secondary to a pre-translational mechanism. Moreover, this study demonstrates that serum mediators responsible for the down-regulation of hepatic P450 a) differ from the mediators in serum responsible for P450 decrease in activity, where the effect of IL-6 and IFN- γ appears prominent, b) differ depending upon the nature of the inflammatory reaction, and c) elicit an effect that differs from that elicited by individual cytokines.

References

1. Morgan E.T. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. **Drug Metab Rev** 1997; **29**: 1129-1188.
2. Chang KC, Lauer B.A., Bell T.D. Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness. **Lancet** 1978; **1**: 1132-1133.
3. Monshouwer M, Witkamp RF. Cytochromes and cytokines: changes in drug disposition in animals during an acute phase response: a mini-review. **Vet Q** 2000 2000; **22**: 17-20.
4. 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.
5. Muntané-Relat J, Ourlin JC, 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.
6. Chen JQ, Strom A, Gustafsson JA, Morgan ET. Suppression of the constitutive expression of cytochrome P-450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: comparison with induction of acute-phase genes and demonstration that CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. **Mol Pharmacol** 1995; **47**: 940-947.
7. 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; **32**: 49-55.
8. Delaporte E, Cribb AE, Renton KW. Modulation of rat hepatic CYP3A1 induction by the interferon inducer polyinosinic acid-polycytidylic acid (polyic). **Drug Metab Dispos** 1993; **21**: 520-523.

9. El-Kadi AOS, 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.
10. Bleau AM, Levitchi MC, 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.
11. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. **Methods Cell Biol** 1976; **13**: 29-83.
12. Huang, W.T., Lin, M.T., Won, S.J. Staphylococcal enterotoxin A-induced fever is associated with increased circulating levels of cytokines in rabbits. **Inf Immunol** 1997; **65**: 2656-2662.
13. Muscettola, M., Girolami, L., Tanganelli, C., Fontani, G., Lupo, C. Immune and endocrine aspects of behaviour in male rabbits. **Neuroimmunomodul** 1995; **2**: 155-160.
14. Hebertson, M.J., Werner, H.A., Goddard, C.M., Russell, J.A., Wheeler, A., Coxon, R., Walley, K.R. Anti-tumor necrosis factor- α prevents decreased ventricular contractility in endotoxemic pigs. **Am J Respir Crit Care Med** 1995; **152**: 480-488.
15. Armant M, Ishihara H, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Regulation of cytokine production by soluble CD23: costimulation of interferon gamma secretion and triggering of tumor necrosis factor alpha release. **J Exp Med** 1994; **180**: 1005-1011.
16. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (). Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951; **193**: 265-275.
17. Kruger NJ. Detection of polypeptides on immunoblots using secondary antibodies or protein A. **Methods Mol Biol** 1994; **32**: 215-226.

18. Thorpe GH, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP. Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. **Clin Chem** 1985; **31**: 1335-1341.
19. Dalet C, Clair P, Daujat M, Fort P, Blanchard JM, Maurel P. Complete sequence of cytochrome P450 3c cDNA and presence of two mRNA species with 3' untranslated regions of different lengths. **DNA** 1988; **7**: 39-46.
20. Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain** 1995; **63**: 289-302.
21. Josephs MD, Solorzano CC, Taylor M, Rosenberg JJ, Topping D, Abouhamze A, Mackay SLD, Hirsch E, Hirsh D, Labow M, Moldawer LL. Modulation of the acute phase response by altered expression of the IL-1 type 1 receptor or IL-1ra. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 2000; **278**: R824-R830
22. Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, Nunes P, Terry R, Cullinan EB, Bartfai T, Solorzano C, Moldawer LL, Chizzonite R, McIntyre KW. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. **J Immunol** 1997; **159**: 2452-2461.
23. Fantuzzi G, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Sipe JD, Kuida K, Flavell RA, Dinarello CA. Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme-deficient mice. **J Immunol** 1997; **158**: 1818-1824.
24. Fantuzzi G, Dinarello CA. Stem cell factor-deficient mice have a dysregulation of cytokine production during local inflammation. **Eur Cytokine Netw** 1998; **9**: 85-82.
25. Sillaber C, Bevec D, Butterfield JH, Heppner C, Valenta R, Scheiner O, Kraft D, Lechner K, Bettelheim P, Valent P. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta mRNA expression in HMC-1 cells: differential regulation of gene product expression by recombinant interleukin-4. **Exp Hematol** 1993; **21**: 1271-1275.

26. Rosoff PM, Savage N, Dinarello CA. Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. **Cell** 1998; **54**: 73-81.
27. El-Kadi AOS, Bleau AM, 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.
28. Bleau AM, Fradette C, El-Kadi AO, Cote MC, 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.
29. Dinarello CA. Blocking interleukin-1 receptors. **Int J Clin Lab Res** 1994; **24**: 61-79.
30. Tesfaigzi Y, Kluger M, Kozak W. Clinical and cellular effects of cytochrome P-450 modulators. **Respir Physiol** 2001; **128**: 79-87.
31. Fattori E, Cappelletti M, Costa P, Sellitto C, Cantoni L, Carelli M, Faggioni R, Fantuzzi G, Ghezzi P, Poli V. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. **J Exp Med** 1994; **180**: 1243-1250.
32. Zheng H, Fletcher D, Kozak W, Jiang M, Hofmann KJ, Conn CA, Soszynski D, Grabiec C, Trumbauer ME, Shaw A. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. **Immunity** 1995; **3**: 9-19.
33. Fantuzzi G, Dinarello CA. The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. **J Leukoc Biol** 1996; **59**: 489-493.
34. Calleja C, Eeckhoutte C, Dacasto M, Larrieu G, Dupuy J, Pineau T, and Galtier P. Comparative effects of cytokines on constitutive and inducible expression of the gene encoding for the cytochrome P450 3A6 isoenzyme in cultured rabbit hepatocytes: consequences on progesterone 6beta-hydroxylation.

Biochem Pharmacol 1998; **56**: 1279-1285.

35. Kozak W, Poli V, Soszynski D, Conn CA, Leon LR, Kluger MJ. Sickness behavior in mice deficient in interleukin-6 during turpentine abscess and influenza pneumonitis. **Am J Physiol** 1997; **272**: R621-R630
36. Ahmed ST, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 and IL-10 Signaling and Stat Activation by Inflammatory and Stress Pathways. **J Immunol** 2000; **165**: 5227-5237.
37. Stanley LA, Adams DJ, Balkwill FR, Griffin D, Wolf R. Differential effects of recombinant interferon α on constitutive and inducible cytochrome P450 isozymes in mouse liver. **Biochem Pharmacol** 1991; **42**: 311-320.
38. Cribb AE, Delaporte E, Kim SG, Novak RF, Renton KW. Regulation of cytochrome P-4501A and cytochrome P-4502E induction in the rat during the production of interferon α/β . **J Pharmacol Exp Ther** 1994; **268**: 487-494.

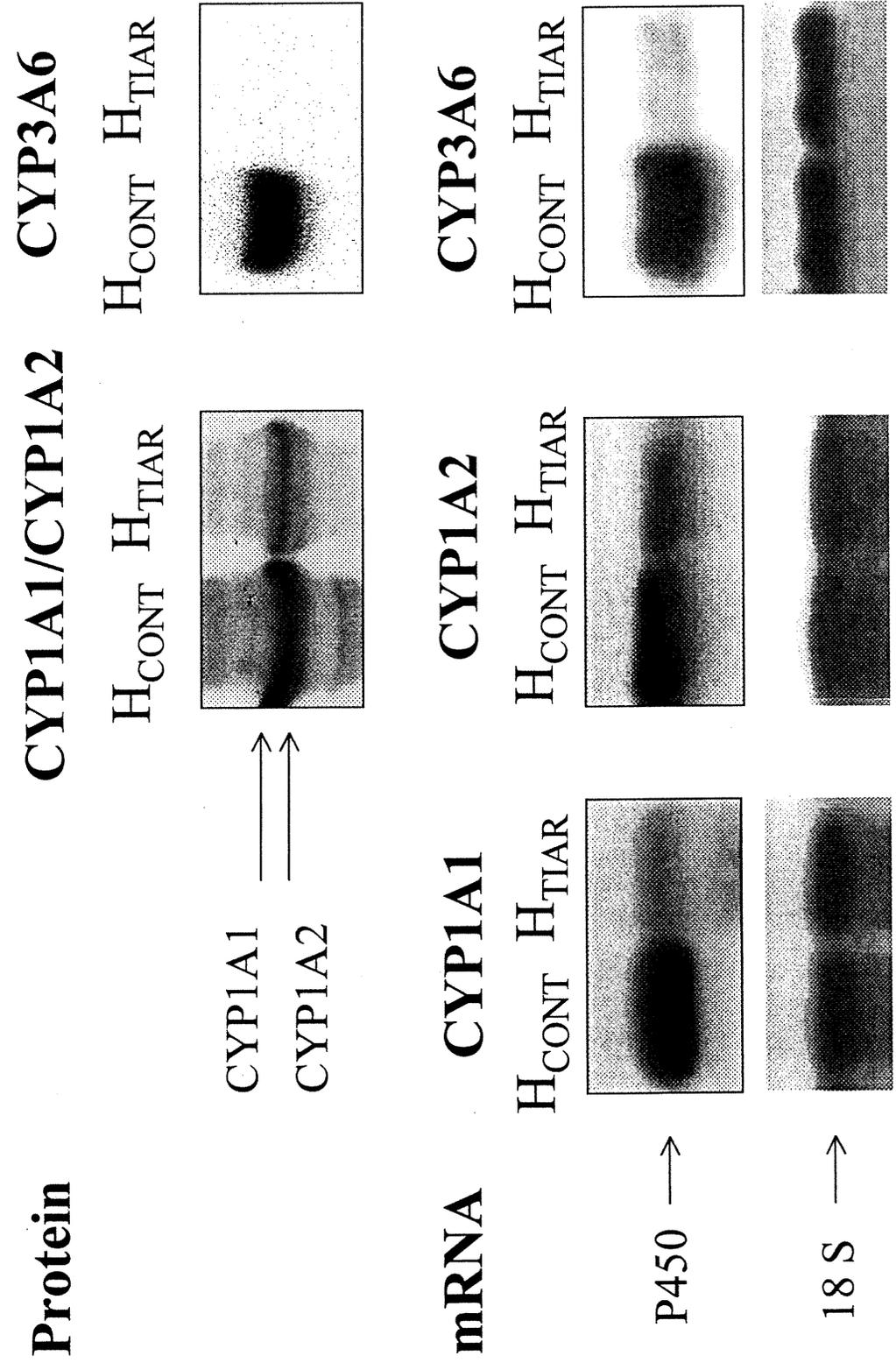


Figure 7.1

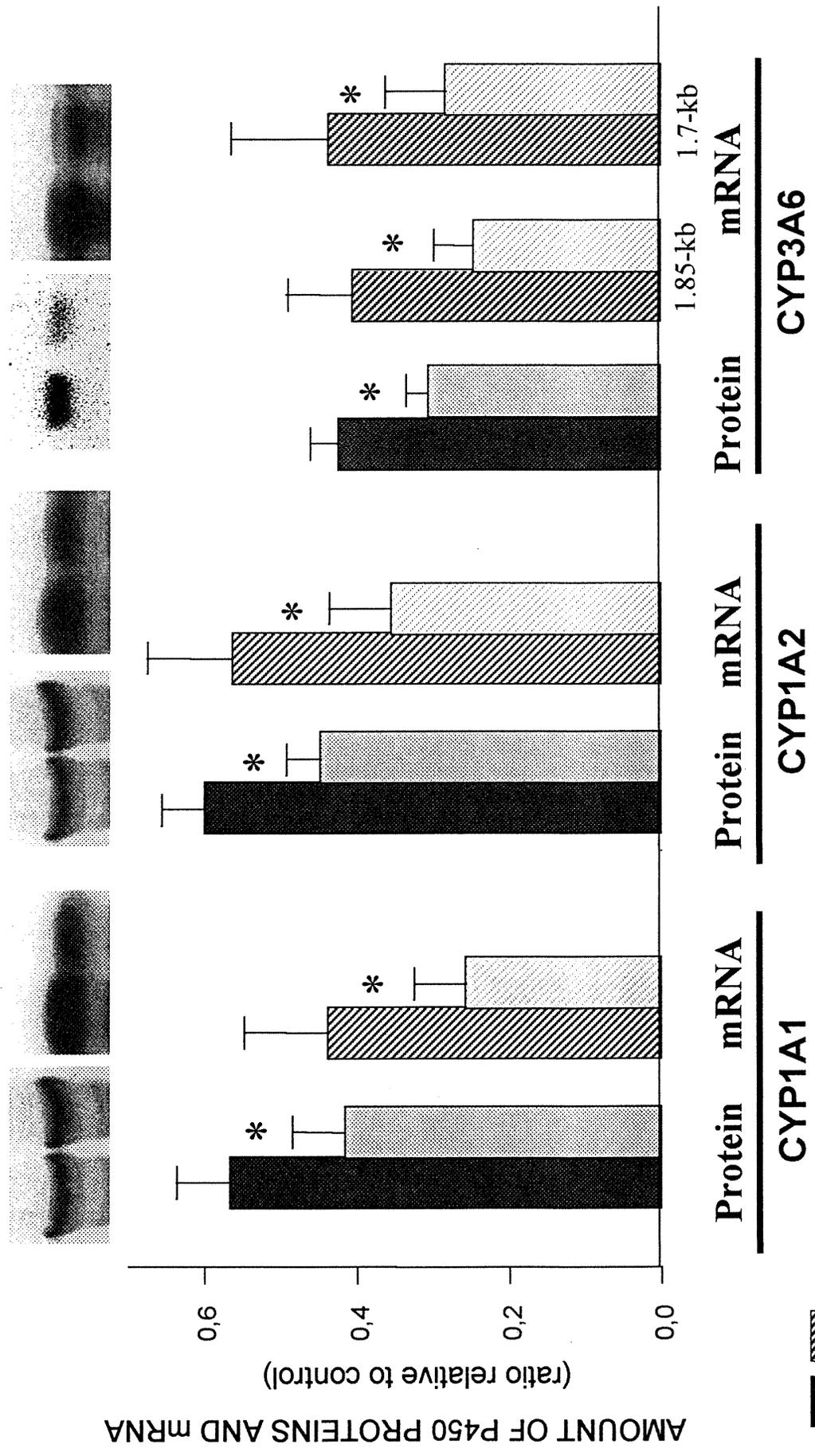


Figure 7.2

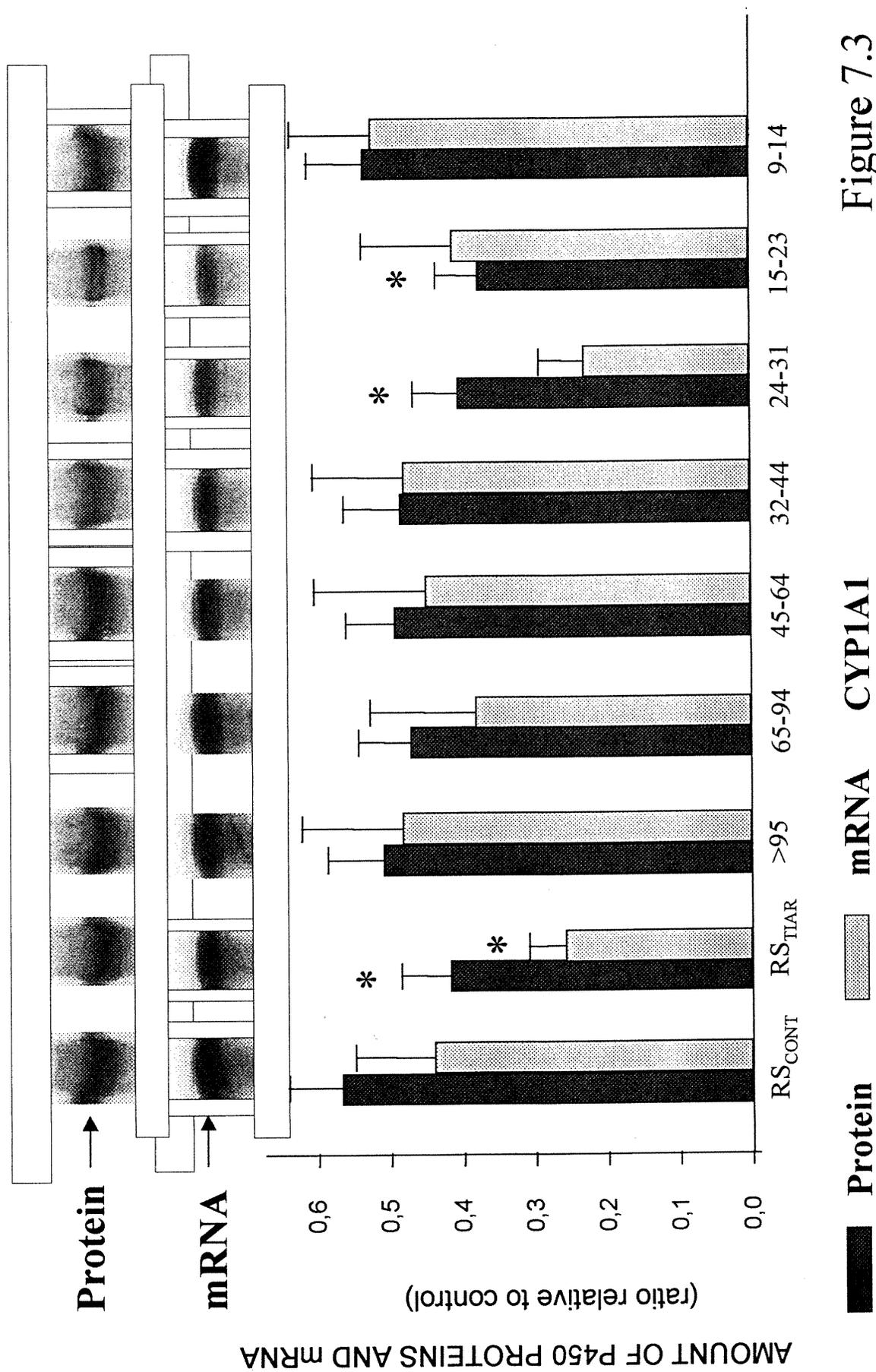


Figure 7.3

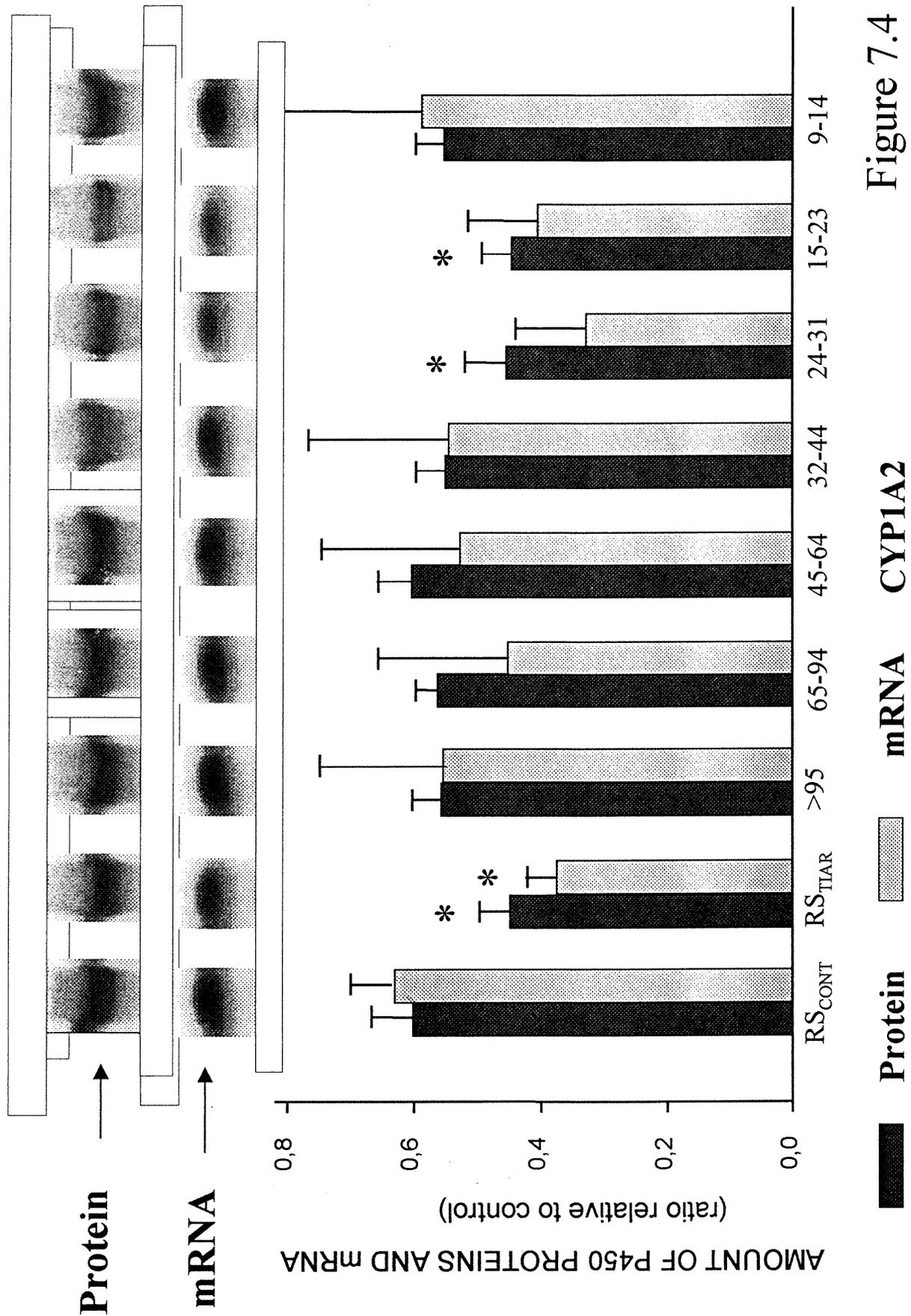


Figure 7.4

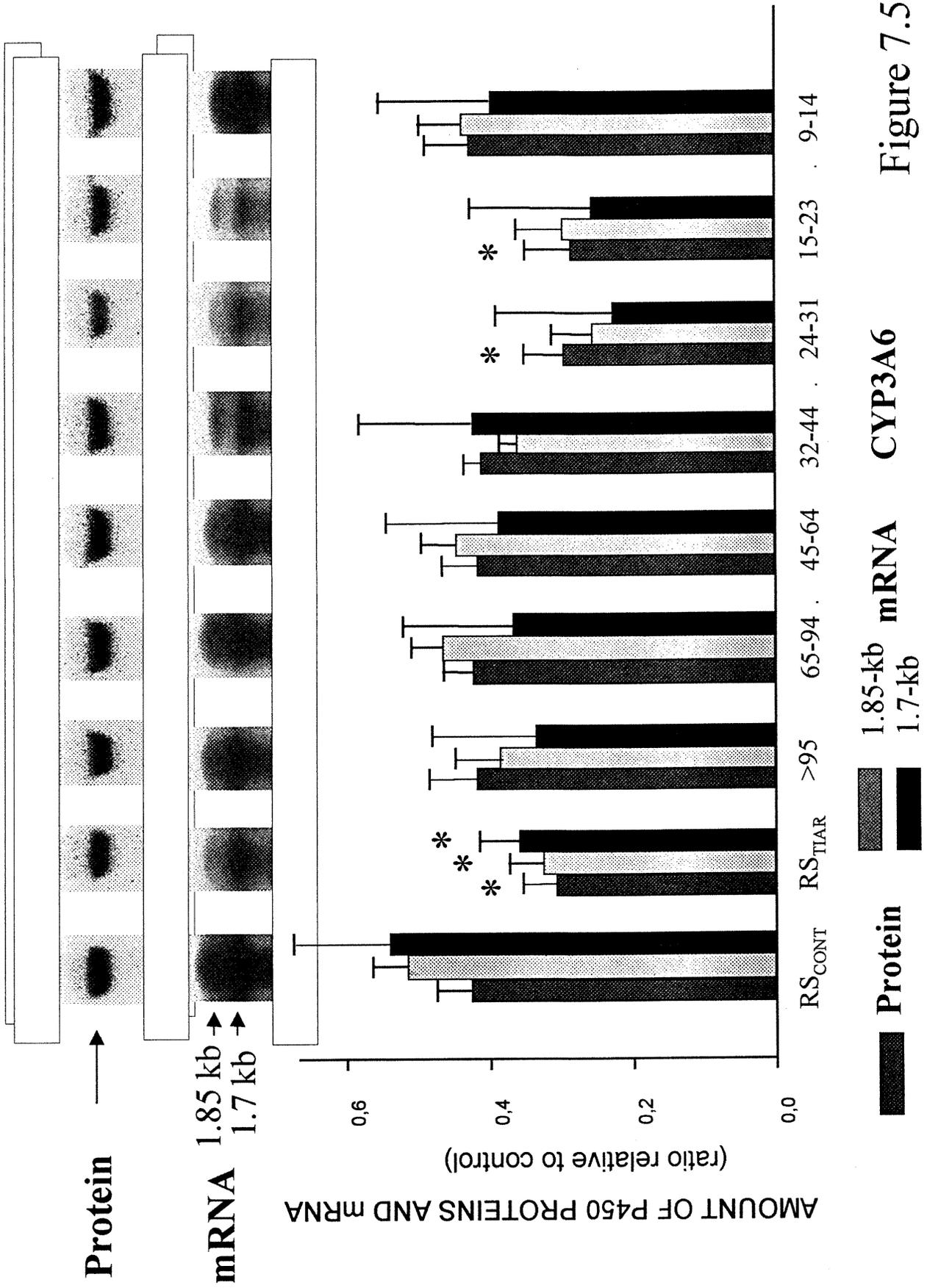
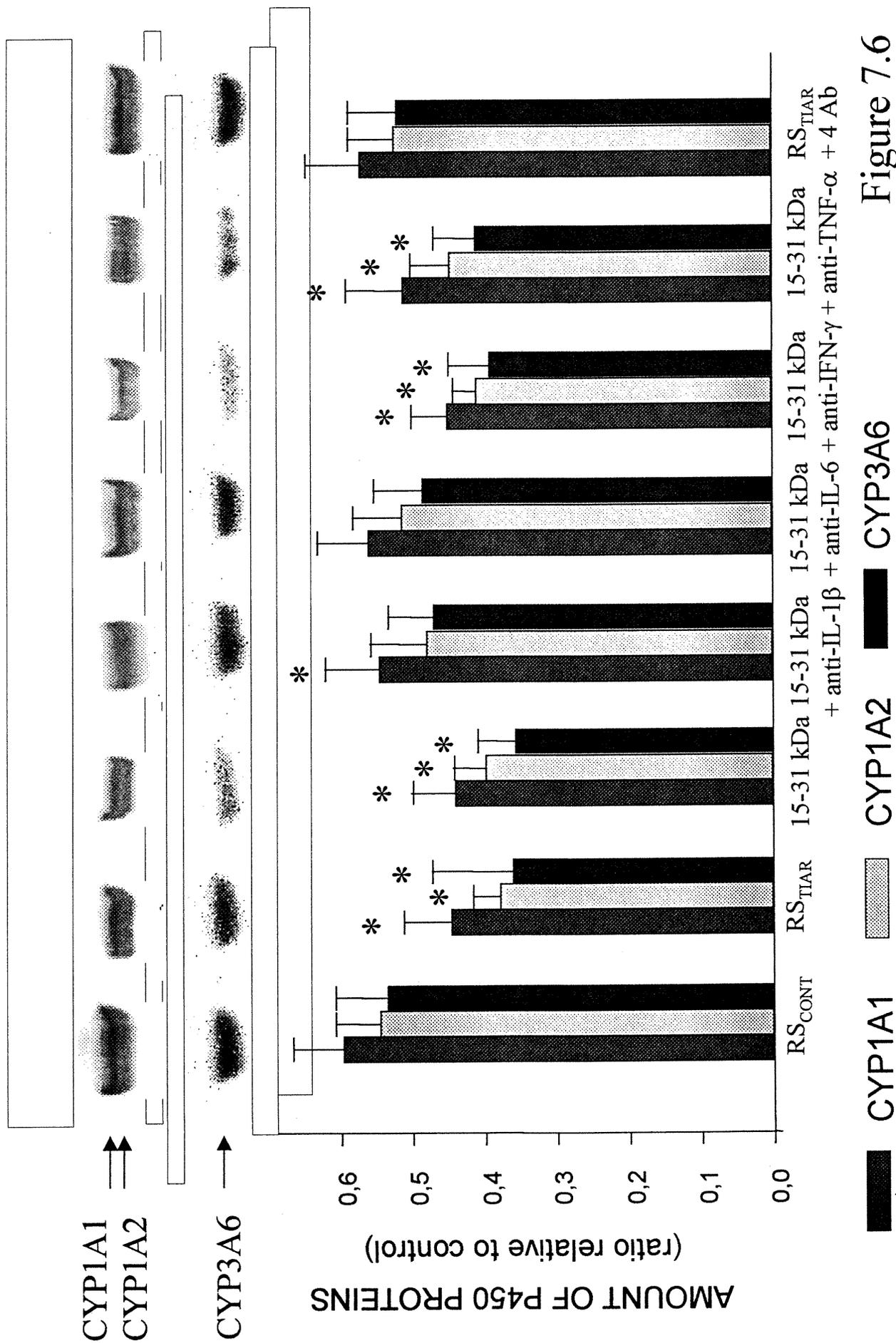


Figure 7.5



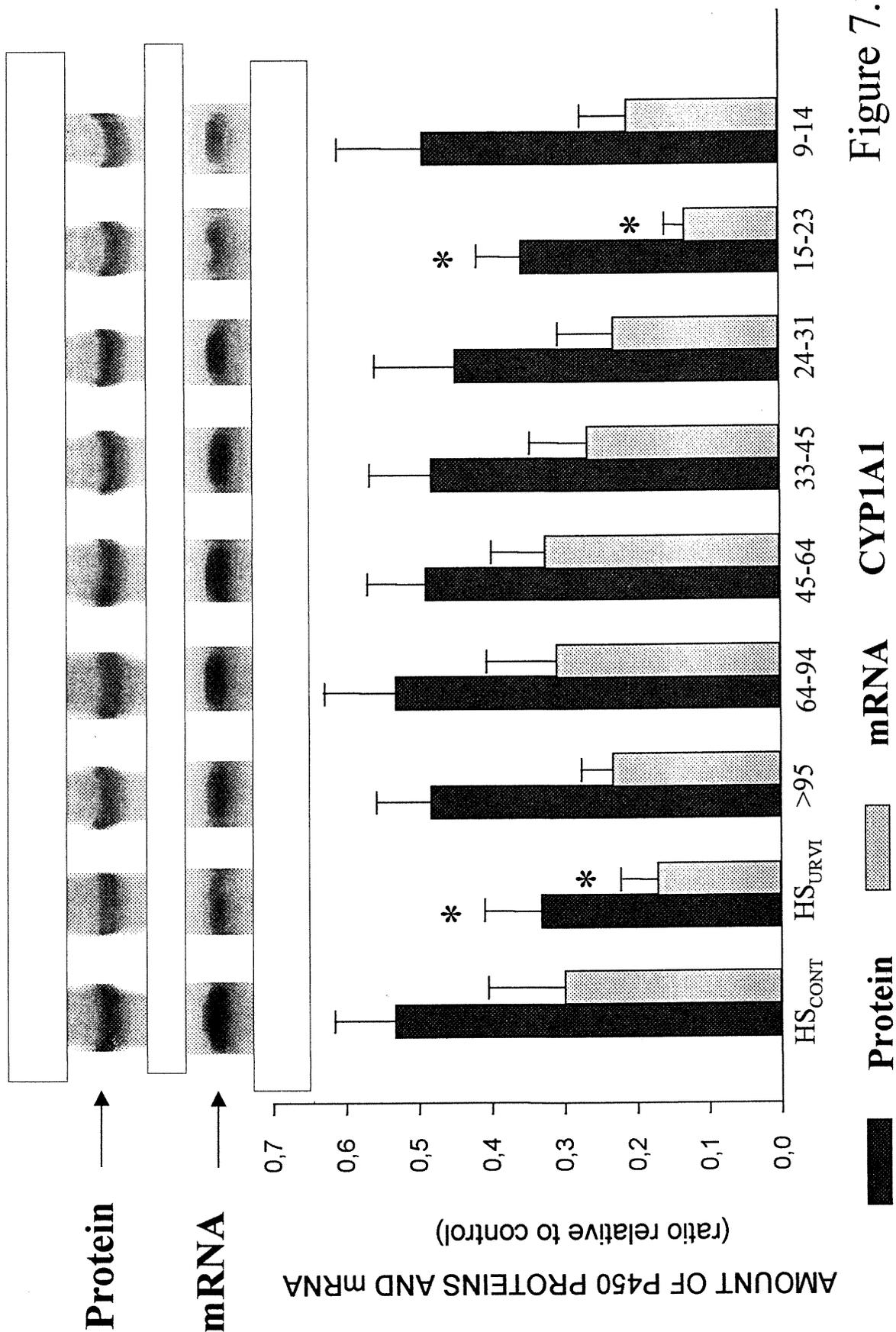


Figure 7.7

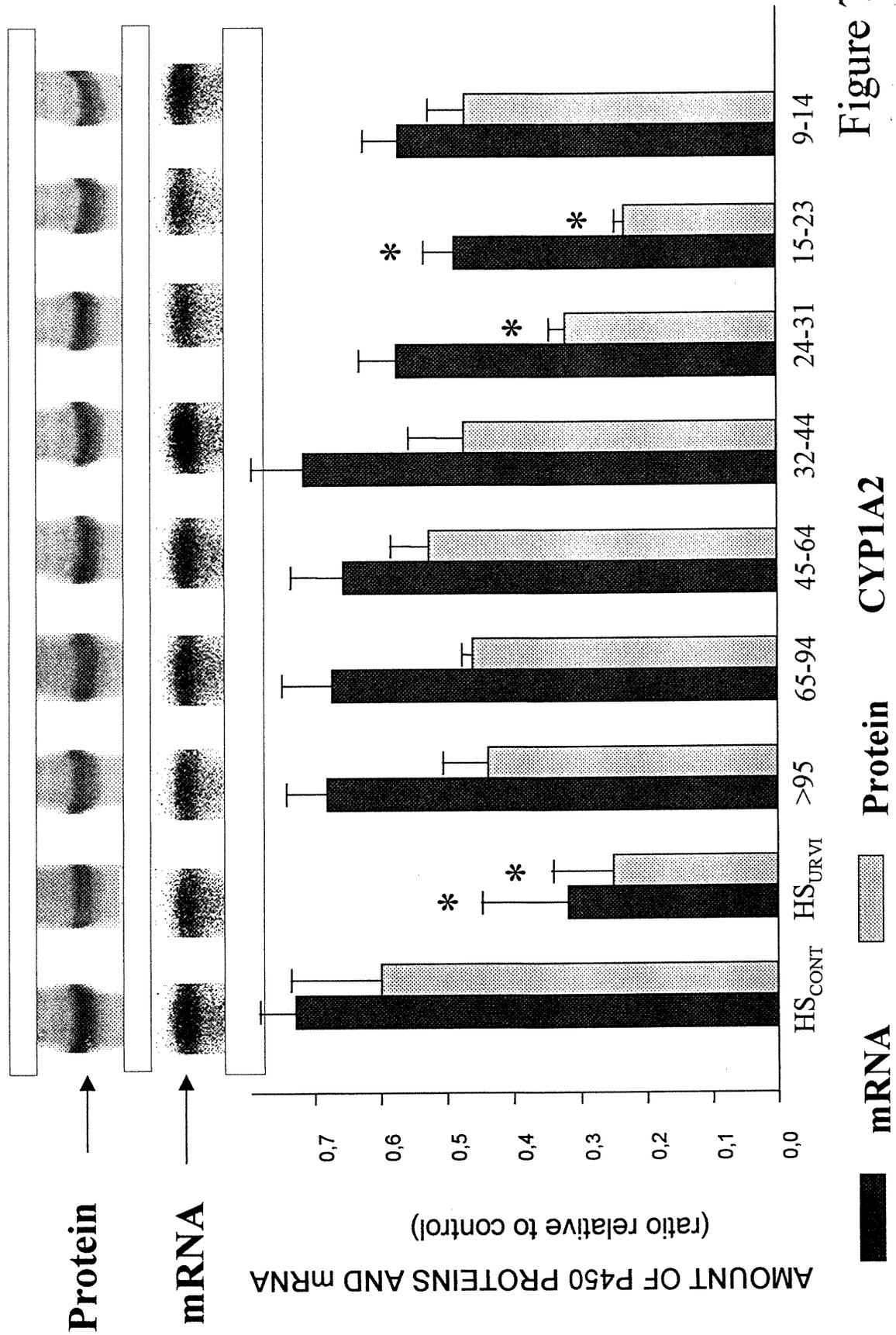


Figure 7.8

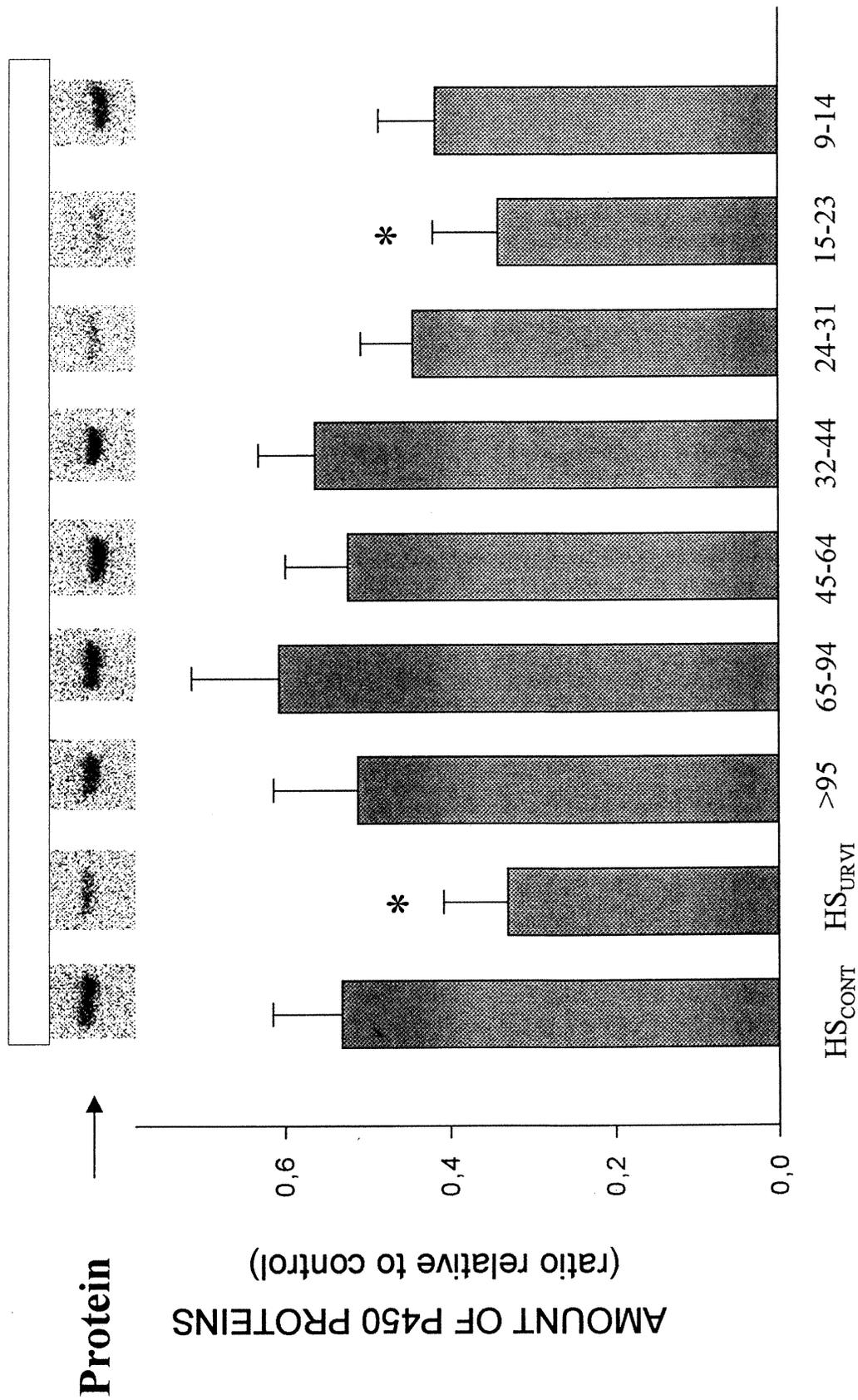


Figure 7.9

Protein CYP3A6

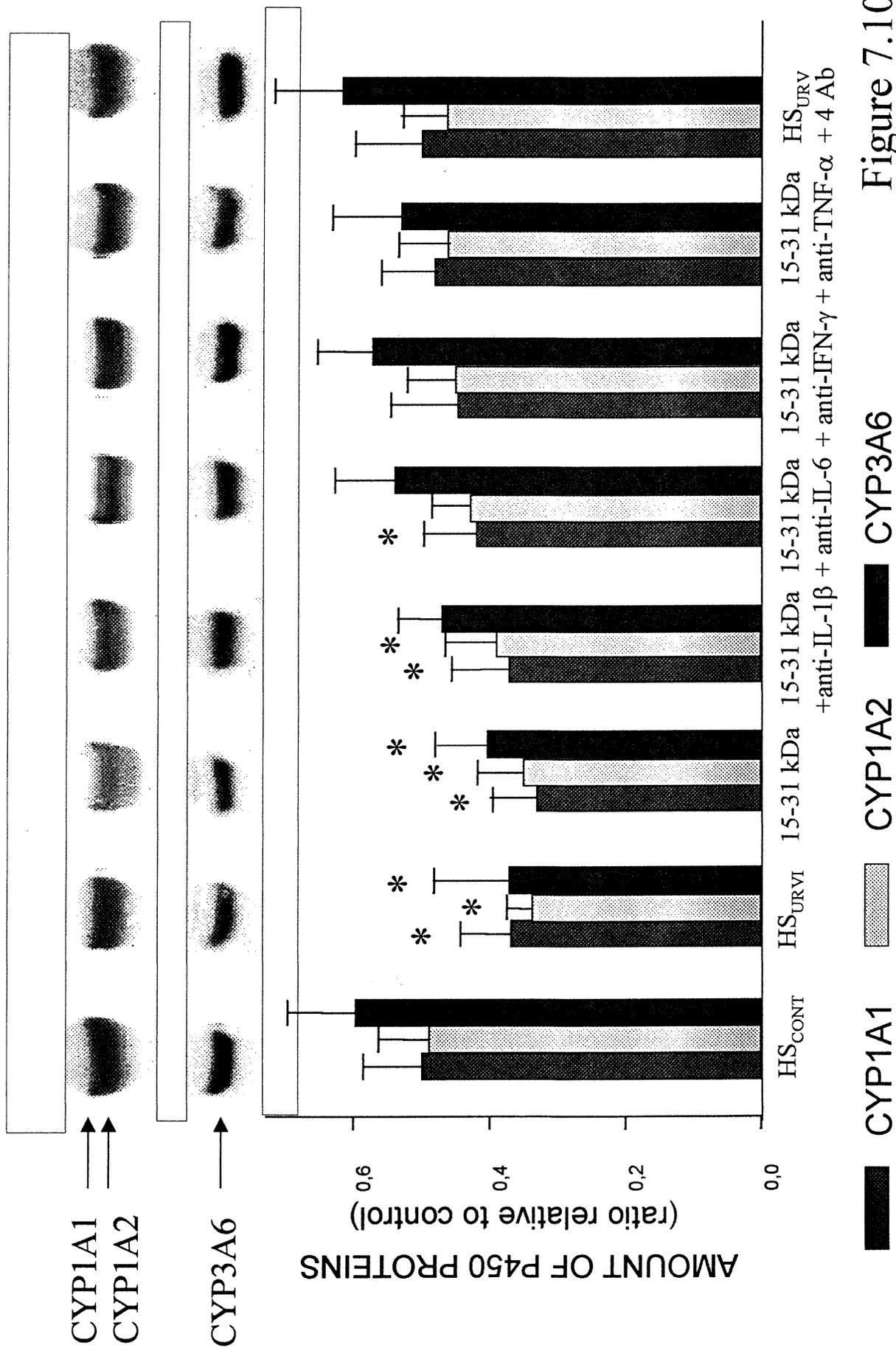


Figure 7.10

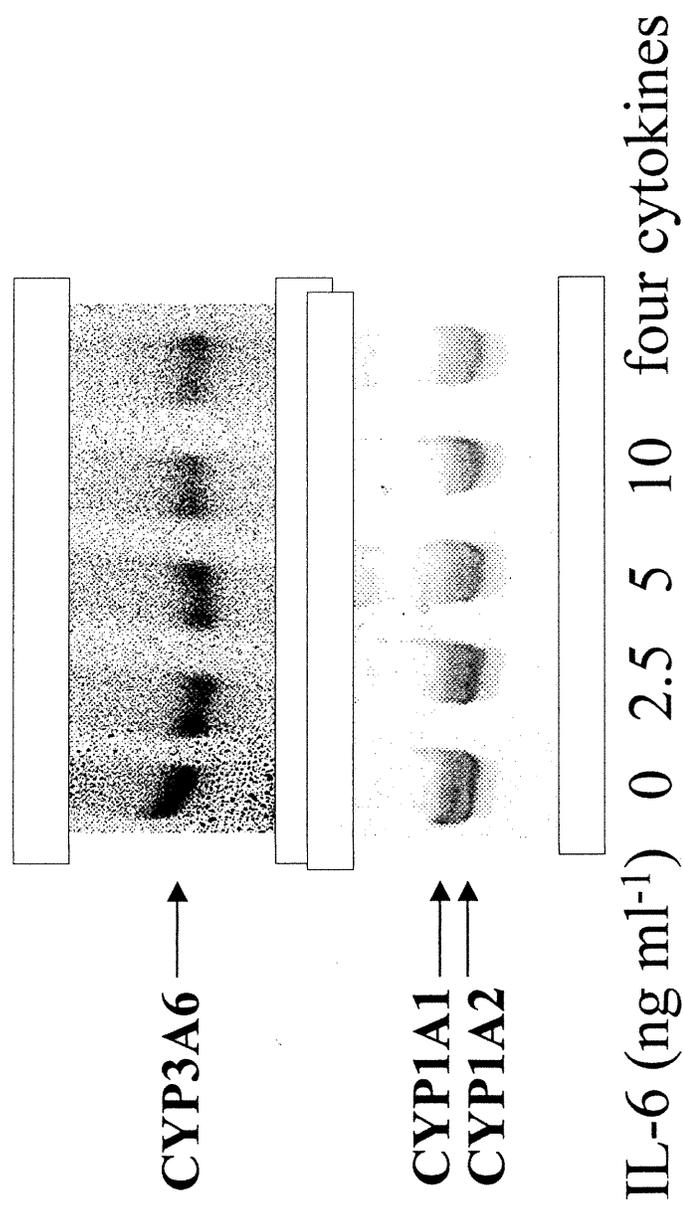


Figure 7.11

Table 7.1. Effect of several cytokines on the expression of CYP1A1, 1A2 and 3A6 depending upon the nature of the inflammatory reaction.

		CYP1A1	CYP1A2	CYP3A6
IL-1 β	RS _{TIIIR}	-	+	+
	HS _{URVI}	-	-	+
IL-6	RS _{TIIIR}	+	+	+
	HS _{URVI}	-	+	+
INF- γ	RS _{TIIIR}	-	-	-
	HS _{URVI}	+	+	+
TNF- α	RS _{TIIIR}	-	-	-
	HS _{URVI}	+	+	+

RS_{TIIIR} is serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction; HS_{URVI} is human serum from individuals with an upper respiratory viral infection.

- denotes absence of effect, and + down-regulation of the P450 isoform.

Legend for figures

Figure 7.1 Representative bands illustrating the amounts of CYP1A1, 1A2 and 3A6 and their mRNAs in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{TIR}), 48 h after the injection of turpentine.

Figure 7.2 Effect of serum from control rabbits (RS_{CONT}) and from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIR}) on CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins ($n = 7$), as well as on *CYP1A1*, *1A2* and *3A6* mRNA amounts ($n = 6$) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. The two forms of *CYP3A6* mRNA (1.85 kb, 1.7 kb) are shown. The upper panel of the figure illustrates representative gels. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control. * $p < 0.05$ compared with RS_{CONT} .

Figure 7.3 Effect of serum from control rabbits (RS_{CONT}), serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIR}) and HPLC fractions of RS_{TIR} on CYP1A1 apoprotein ($n = 7$) and *CYP1A1* mRNA ($n = 3$) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. The upper panel of the figure illustrates representative gels. Values on the abscissa correspond to M_r of the proteins contained in each HPLC fraction. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control. * $p < 0.05$ compared with RS_{CONT} .

Figure 7.4 Effect of serum from control rabbits (RS_{CONT}), serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIR}) and HPLC fractions of RS_{TIR} on CYP1A2 apoprotein ($n = 4$) and *CYP1A2* mRNA ($n = 3$) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. The upper panel of the figure illustrates

representative gels. Values on the abscissa correspond to Mr of the proteins contained in each HPLC fraction. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control.

* $p < 0.05$ compared with RS_{CONT} .

Figure 7.5 Effect of serum from control rabbits (RS_{CONT}), serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIIR}) and HPLC fractions of RS_{TIIR} on CYP3A6 apoprotein ($n = 4$) and *CYP3A6* mRNA ($n = 3$) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. The upper panel of the figure illustrates representative gels. Values on the abscissa correspond to Mr of the proteins contained in each HPLC fraction. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control.

* $p < 0.05$ compared with RS_{CONT} .

Figure 7.6 Effect of anti-cytokine antibodies (Ab) on the ability of the 15-31 kDa HPLC fraction of serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIIR}) to reduce the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins after 48 h of incubation with hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}). The upper panel of the figure illustrates representative gels. RS_{CONT} : serum from control rabbits. Values on the abscissa correspond to Mr of the proteins contained in each HPLC fraction. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control. * $p < 0.05$ compared with RS_{CONT} ($n = 4$).

Figure 7.7 Effect of human serum from controls (HS_{CONT}) and subjects with an upper respiratory tract viral infection reaction (HS_{URVI}), and of HPLC fractions of HS_{URVI} on CYP1A1 apoprotein ($n = 4$) and *CYP1A1* mRNA ($n = 3$) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. The upper panel of the figure illustrates representative gels. Values on the abscissa correspond to Mr of the proteins contained in

each fraction. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control. * $p < 0.05$ compared with HS_{CONT}.

Figure 7.8 Effect of human serum from controls (HS_{CONT}) and subjects with an upper respiratory tract viral infection reaction (HS_{URVI}), and of HPLC fractions of HS_{URVI} on CYP1A2 apoprotein (n = 4) and *CYP1A2* mRNA (n = 3) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. The upper panel of the figure illustrates representative gels. Values on the abscissa correspond to Mr of the proteins contained in each fraction. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control. * $p < 0.05$ compared with HS_{CONT}.

Figure 7.9 Effect of human serum from controls (HS_{CONT}) and subjects with an upper respiratory tract viral infection reaction (HS_{URVI}), and of HPLC fractions of HS_{URVI} on CYP3A6 apoprotein (n = 4) in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) after 48 h of incubation. The upper panel of the figure illustrates representative gels. Values on the abscissa correspond to Mr of the proteins contained in each fraction. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control. * $p < 0.05$ compared with HS_{CONT}.

Figure 7.10 Effect of anti-cytokine antibodies (Ab) on the ability of the 15-31 kDa HPLC fraction of serum from volunteers with an upper respiratory tract viral infection reaction (HS_{URVI}) to reduce the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins after a 48 h of incubation with hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}). The upper panel of the figure illustrates representative gels. HS_{CONT}: serum from healthy volunteers. Values on the abscissa correspond to Mr of the proteins contained in each fraction. Data are mean \pm s.e. of the ratio of the sample over the control. * $p < 0.05$ compared with HS_{CONT}.

Figure 7.11 Effect 0, 2.5, 5 and 10 ng/ml of recombinant human IL-6 (lanes 1 to 4) and of the combination of IL-6, IL-1 β , TNF- α and IFN- γ (5 ng/ml) on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins after a 48 h period of incubation with hepatocytes from control rabbits.

CHAPITRE 8

DISCUSSION

L'impact de la réaction inflammatoire sur la clairance des médicaments est un concept bien établi en pharmacologie, il repose sur des bases tant cliniques qu'expérimentales. La fréquence accrue des réactions indésirables provoquées par l'inflammation revêt une importance majeure surtout pour les médicaments à faible indice thérapeutique. Nos travaux et ceux d'autres groupes ont démontré que la diminution du métabolisme hépatique observée durant l'inflammation résulte d'une baisse de l'activité et de l'expression d'isoformes du P450. Nos objectifs principaux visent à identifier les médiateurs spécifiques impliqués et à caractériser les mécanismes mis en jeu dans la réaction inflammatoire qui mènent à la diminution de l'activité et à la régulation négative du P450. À cette fin, nous avons utilisé deux modèles d'inflammation.

Les modèles d'inflammation

La réaction déclenchée par l'injection sous-cutanée de térébenthine représente un modèle valide pour étudier les effets de l'inflammation aiguë de type aseptique sur le métabolisme de composés endogènes et exogènes. Les étapes du processus inflammatoire se déroulent localement avec libération de médiateurs pour la défense de l'organisme. *In vivo*, une RIA de ce type entraîne une réduction de la biotransformation de plusieurs médicaments tels le tolbutamide et la théophylline, ainsi que de composés tel l'antipyrine (Parent C et coll., 1992; Sonne J et coll., 1985). Cette baisse de l'activité métabolique résulte d'une part de la diminution du niveau d'ARNm d'isoformes du P450 ainsi de la quantité des protéines correspondantes (Parent C et coll., 1992; Barakat M et du Souich P, 1996; Bleau AM et coll., manuscrit en préparation). D'autre part, la régulation négative du P450 s'accompagne d'une baisse de l'activité (El-Kadi AOS et coll., 1997). La réduction du P450 atteint son maximum 48 hr suivant l'induction de la réaction, au moment du pic de concentration des séromucoïdes sanguins. Il est important

de souligner que notre laboratoire a démontré que la térébenthine ou ses métabolites n'affectent pas directement le P450 hépatique: au contraire, la térébenthine administrée par gavage agit comme un inducteur des enzymes du P450 (Kobusch AB et coll., 1986).

L'équipe de P. Maurel a démontré qu'en conditions optimales les hépatocytes de lapin *ex vivo* demeurent bien différenciés durant le procédé de culture cellulaire: le traitement des cellules par la rifampicine et la dexaméthasone induit l'ARNm du CYP3A6, et la β -naphthoflavone ceux des CYP1A1 et 1A2 (Daujat M et coll., 1987). Notons que l'étude de la régulation du P450 hépatique par l'inflammation a le plus souvent fait appel aux cultures d'hépatocytes de rats, et dans une moindre mesure aux hépatocytes humains; les résultats de ces études concordent avec ceux obtenus chez le lapin (Parent C et coll., 1992; Abdel-Razzak Z et coll., 1993; Muntané-Relat J et coll., 1995; Calleja C et coll., 1998).

Il est également bien établi que l'infection virale chez l'humain entraîne une diminution du métabolisme de xénobiotiques, causée par la baisse du P450 hépatique. Cet effet résulte de la relâche de médiateurs dans le sang, principalement l'IFN- γ , pour la défense de l'hôte. Ce type de réaction inflammatoire représente donc un second modèle judicieux pour identifier les médiateurs sériques agissant sur le P450.

In vitro, l'addition de cytokines à des hépatocytes en culture reproduit les phénomènes observés *in vivo*, c'est-à-dire une diminution de l'activité et de l'expression des isoformes du P450; toutefois un doute sérieux persistait quant à la nature physiologique des effets observés (Morgan ET, 1997). Dans nos travaux, l'utilisation de sérums provenant de lapins avec une RIA et d'humains avec une IVVRS a permis de confirmer la présence de médiateurs dans le sang, à des concentrations assurément physiologiques, et capables d'agir de façon similaire au niveau du foie et de diminuer le

P450. De plus, la neutralisation directe de l'activité de médiateurs permet de cibler les cytokines effectivement sécrétées dans le sérum et qui exercent un effet sur le P450.

Notons que le profil temporel d'expression des cytokines change au cours de la réaction inflammatoire, on ne peut donc exclure la possibilité que d'autres médiateurs, absents lors du prélèvement, puissent également agir sur le P450. Toutefois, l'intensité du processus inflammatoire culmine 48 heures après l'injection de térébenthine, tel que démontré par la concentration maximum de séromucoïdes et le pic de température corporelle: ceci justifie notre choix quant au moment où sont effectués les prélèvements sanguins chez l'animal.

Pour les sérums humains, le sang est prélevé 2 ou 3 jours suivant le début de l'infection virale, un temps où les symptômes sont les plus prononcés. Les signes apparents de l'inflammation virale sont l'écoulement et la congestion nasale, les éternuements, la toux, la fièvre, l'angine, l'hypophagie et des signes systémiques de malaise, en absence de sécrétions purulentes. L'intensité de la réponse à l'infection virale varie d'un individu à l'autre et selon le type de virus, résultat des grandes différences dans la production de cytokines ou d'autres médiateurs. Une étude récente a montré que suite à l'infection par le virus de l'influenza, la concentration sérique en IL-1 β augmente graduellement, celle de l'IL-6 est élevée et persiste durant l'inflammation tandis que le TNF- α demeure indétectable durant les premières 72 heures (Konstantinos AP et Sheridan JF, 2001). Le moment du prélèvement sanguin par rapport au début de la maladie constitue donc une autre source de variation. La production de cytokines peut également varier selon l'âge: par exemple la sécrétion d'IFN- γ se voit atténuée chez les personnes âgées comparativement aux plus jeunes, expliquant en partie la plus grande morbidité et le taux plus élevé de mortalité observés chez ces patients (Ouyang Q et coll., 2000).

Il a été proposé que les symptômes cliniques de la maladie contribuent aux changements adaptatifs pour la défense de l'hôte. L'étude de souris rendues déficientes en IL-6 a montré que cette cytokine joue un rôle critique dans l'induction des symptômes durant l'inflammation aseptique, alors que ceux observés durant l'influenza sont aussi intenses que chez les souris de souche sauvage, suggérant que le rôle de l'IL-6 dans les conséquences de l'infection virale soit relativement moins important que celui d'autres cytokines (Kozak W et coll., 1997).

Les médiateurs de la diminution d'activité du P450

En regard du P450 hépatique, la diminution de l'activité, dont l'effet survient généralement à l'intérieur d'un court laps de temps, constitue le premier changement observé durant l'inflammation. Cette baisse d'activité a été démontrée dans notre laboratoire par la réduction – en 4 heures – du contenu total en P450 et du métabolisme de la théophylline dans des hépatocytes en culture, sans changement de la quantité en protéines (El-Kadi AOS et coll., 1997). La diminution de l'activité est plus prononcée dans des hépatocytes provenant de lapins avec une RIA, probablement à cause de la présence d'une plus grande concentration de récepteurs aux cytokines à la surface cellulaire. Il se produit effectivement une augmentation de l'expression de ces récepteurs environ 6 hr après l'induction de la réaction inflammatoire (Dinarelo CA, 1994). Le phénomène de réduction de l'activité persiste durant le processus inflammatoire car il est toujours présent après 24 hr d'incubation. Toutefois, après des périodes de 24 et 48 hr, il se produit également une régulation négative du P450, démontrée par une réduction des niveaux d'ARNm pour les CYP1A1/A2 et 3A6 et des protéines correspondantes (Bleau AM et coll., manuscrit en préparation). Il est à noter que *in vivo*, 48 heures après l'induction d'une RIA chez le lapin, les phénomènes de réduction d'activité et de

régulation négative du P450 coexistent. Le L-NAME prévient partiellement la diminution de l'activité sans produire d'effet sur la régulation négative (Barakat MM et coll., 2001).

L'équipe de E.T. Morgan a également observé une réduction de l'activité catalytique du CYP2C11 6 heures après le traitement au LPS, sans changement dans le contenu protéique (Sewer MB et Morgan ET, 1998). L'IL-1 β cause elle aussi une baisse d'activité du P450 dans des hépatocytes de lapins, démontrée par la réduction plus importante de l'activité progestérone hydroxylase que de la quantité de protéine du CYP3A6 (Calleja C et coll., 1998). En effet, l'IL-1 β peut entraîner une perte de l'hème en induisant la hème oxygénase, l'enzyme responsable de la dégradation de l'hème du P450 (Rizzardini M et coll., 1994).

Dans des hépatocytes provenant de lapins avec une RIA, nous avons identifié – par neutralisation de l'activité de cytokines – les médiateurs responsables de la réduction du contenu total en P450, c'est-à-dire pour l'ensemble des isoformes. Dans l'inflammation induite par l'injection s.c. de térébenthine, l'IL-6 est en totalité responsable de la diminution de l'activité du P450, tandis que chez l'humain avec une IVVRS, ce sont l'IFN- γ , l'IL-6 et l'IL-1 β qui participent au processus. Le sérum humain produit une inactivation du P450 total plus grande que le sérum de lapin, possiblement parce qu'il contient plus de médiateurs actifs.

Les médiateurs de la régulation négative du P450

Suite à l'exposition des hépatocytes aux sérums, nous avons observé une diminution de la quantité de protéines des CYP1A1/1A2 et 3A6, tant dans les hépatocytes de lapins normaux que ceux avec une RIA. Toutefois, tel qu'observé pour la diminution

de l'activité, cette baisse est plus prononcée dans les hépatocytes provenant de lapins avec une RIA, témoignant encore de leur plus grande sensibilité. Étant donné que les niveaux d'ARNm de ces isoformes sont fortement réduits 48 hr après l'induction de la réaction inflammatoire, ils deviennent indétectables 24 hr suivant la mise en culture des hépatocytes. Pour cette raison, nos travaux sur la répression du P450 ont été effectués sur des hépatocytes de lapins normaux. De plus, l'utilisation de ces hépatocytes permet de simuler les conditions qui prévalent à compter du moment de l'induction de la réaction inflammatoire.

Dans notre modèle, le sérum issu de lapins avec une RIA cause une diminution des niveaux d'ARNm pour les CYP1A1/A2 et 3A6, laquelle rend compte de la baisse en protéines correspondantes. Cette baisse du P450 est plus prononcée à 48 hr qu'à 24 hr. Ces résultats suggèrent que les médiateurs agissent via un mécanisme de contrôle transcriptionnel. Le fractionnement des protéines sériques a permis de confirmer cet effet et d'obtenir une indication quant à la nature des médiateurs impliqués: à savoir une baisse des ARNm et des protéines correspondantes induite par les fractions contenant des protéines de Mr 15 à 31 kDa. Les poids moléculaires des cytokines les plus vraisemblablement impliquées dans la baisse des ARNm sont inclus dans cet intervalle. L'immuno-neutralisation de l'activité de différentes cytokines a démontré que l'IL-6 est responsable de la régulation négative du CYP1A1, l'IL-1 β et l'IL-6 des CYP1A2 et CYP3A6.

Le sérum d'humains avec IVVRS produit une diminution plus marquée des ARNm et des protéines des CYP1A1 et 1A2 que le sérum de lapins avec une RIA. Encore une fois, la baisse d'ARNm explique la baisse de la quantité de protéines, suggérant un mécanisme de contrôle transcriptionnel. Ce phénomène s'est confirmé par

l'ajout de la fraction de Mr 15 à 31 kDa. De façon surprenante, le CYP3A6 semble montrer un mécanisme de régulation différent suite à l'exposition au sérum et aux fractions. Bien que le sérum total entraîne une diminution du niveau d'ARNm, la fraction contenant les protéines de 15 à 31 kDa ne produit pas de baisse. Cette même fraction entraîne cependant une réduction de la quantité de protéines. Ces résultats s'apparentent à ceux de l'équipe de C. Calleja: ils observent l'absence d'effet de l'IFN- γ sur l'ARNm du CYP3A6, mais une réduction de la quantité de la protéine (Calleja C et coll., 1998). Dans nos travaux, la neutralisation de l'activité de cytokines dans ces sérums a montré que l'IFN- γ et le TNF- α sont responsables de la répression du CYP1A1; l'IL-6, l'IFN- γ et le TNF- α du CYP1A2; et les quatre cytokines (IL-1 β , IL-6, IFN- γ et TNF- α) du CYP3A6. Notre interprétation de l'action de l'IFN- γ (ARNm vs protéines) et de la régulation du CYP3A6 sera présentée dans la section qui suit.

Dans le sérum d'humains avec une infection virale, une différence apparaît quant à la fraction active qui produit une baisse d'activité du P450 totale versus celle qui entraîne une régulation négative des isoformes du P450, c'est-à-dire entre la fraction contenant des protéines de plus de 95 kDa et celle de 15-23 kDa. Au niveau de l'activité, seulement la fraction de >95kDa donne une baisse significative du P450, toutefois la baisse produite par la fraction de 15-23 kDa est presque égale à celle du sérum total. Ceci peut s'expliquer par l'écart type des moyennes, le nombre d'échantillons à comparer et le test statistique employé. Effectivement, par une analyse de variance sur des valeurs répétées, la baisse d'activité produite par la fraction de Mr 15-23 kDa est significative. Un phénomène similaire s'observe au niveau de la régulation négative du P450: la fraction de 15 à 23 kDa entraîne une baisse significative des trois isoformes du P450, on note cependant que la fraction >95 kDa semble également produire une légère baisse,

principalement au niveau de l'ARNm. La différence des résultats, observée entre l'activité et l'expression, peut s'expliquer principalement par la sensibilité des hépatocytes (i.e. de lapins témoins ou avec une RIA). Il est possible que par leur plus grande concentration de récepteurs aux cytokines à la surface cellulaire, les hépatocytes de lapins avec RIA possèdent une plus grande affinité pour le complexe cytokine-protéine liante. Également, les sérums utilisés (variation inter-individuelle dans la réponse à l'infection virale), le temps d'incubation (4 versus 48 heures) et le type de mesures effectué (P450 total versus isoforme spécifique du P450) peuvent influencer la réponse. Ces hypothèses restent toutefois à confirmer.

Comparaisons des études portant sur les médiateurs responsables de la baisse du P450

La grande majorité des études traitant des effets de l'inflammation sur le P450 a été réalisée en utilisant le rat ou la souris comme modèles animaux; seules quelques équipes travaillent sur des hépatocytes humains ou de lapin. Le laboratoire de P. Galtier travaille depuis plusieurs années chez le lapin, il s'avère donc pertinent de comparer dans le détail nos résultats avec les leurs.

Dans des cultures d'hépatocytes de lapin, ces auteurs ont rapporté que l'IL-1 β , l'IL-2 et l'IFN- γ réduisent l'expression du CYP3A6 selon des modalités différentes. L'IL-1 β et l'IL-2 sont équipotents pour diminuer en 24 hr l'expression induite du CYP3A6, sans toutefois affecter le niveau basal. L'IFN- γ , quant à lui, réduit fortement les niveaux basal et induit des protéines du CYP3A6, ainsi que de son activité, sans affecter les ARNm correspondants (Calleja C et coll., 1997; Calleja C et coll., 1998). L'effet de l'IL-1 β étant plus prononcé au niveau de l'ARNm que de la quantité de

protéines, les auteurs ont donc proposé un effet sur la transcription comme mécanisme de régulation. L'IL-1 β entraîne également une diminution de l'activité spécifique de l'enzyme CYP3A6: le déclin d'activité progestérone hydroxylase excédant la perte en protéine correspondante. La co-incubation de l'IL-1 β et de l'INF- γ ne produit pas d'effet cumulatif sur la quantité induite de CYP3A6, suggérant que les mécanismes mis en jeu ne sont pas complémentaires (Calleja C et coll., 1998). Étant donné l'absence d'un effet cumulatif, une dégradation directe de la protéine sous l'effet de l'IFN- γ est exclue. L'équipe de P. Galtier conclut que la diminution de l'activité du CYP3A6 par les différentes cytokines se fait via des voies de signalisation différentes: l'INF- γ agirait par un mécanisme de régulation post-transcriptionnel en inhibant la traduction de l'ARNm du CYP3A6, tandis que l'IL-1 β produirait son effet au niveau de la transcription du gène.

L'IL-1 β et l'INF- γ réduisent également l'induction de la O-désalkylation de l'éthoxyrésorufine (EROD) dans des cultures d'hépatocytes de lapin, mais la combinaison de ces cytokines ne majore pas l'effet. Ceci indique un rôle spécifique pour chaque cytokine. L'IL-1 β , l'INF- γ et l'IL-2 réduisent la quantité de protéines du CYP1A1 induit, l'IFN- γ étant la plus puissante cytokine à cet égard. Dans le cas du CYP1A2, seul l'IFN- γ réduit l'induction de la quantité de protéines. Toutefois, la combinaison de cytokines produit un effet cumulatif, par le biais de la combinaison de différentes voies de signalisation, incluant des mécanismes qui demeurent inefficaces lorsque les cytokines sont incubées individuellement. L'IL-1 β a produit une baisse plus marquée de l'activité EROD et de la O-déméthylation de la méthoxyrésorufine (MROD) que de la quantité des protéines correspondantes, suggérant une inactivation du P450 (Calleja C et coll., 1997).

Nous avons observé que dans le sérum d'humains avec IVVRS, la fraction de Mr 15 à 30 kDa produit également une baisse de protéines du CYP3A6 mais sans diminution

de l'ARNm correspondant. Ceci est compatible avec une diminution du taux de traduction. Si la dégradation de l'ARNm du CYP3A6 est dépendante de sa traduction – phénomène observé pour plusieurs ARNm – ceci pourrait expliquer l'absence de baisse en ARNm du CYP3A6 sous l'effet de la fraction 15-30 kDa du sérum. Cette explication est plausible car nos résultats d'immuno-neutralisation ont montré que l'IFN- γ est une des cytokines actives dans la fraction de 15-30 kDa, avec un effet prédominant comparativement à d'autres médiateurs sur le CYP3A6.

Dans notre modèle animal d'inflammation aseptique, l'IL-1 β et l'IL-6 sont les cytokines responsables de la régulation négative du P450, alors que seule l'IL-6 est impliquée dans la diminution de l'activité. Il est connu que la réponse inflammatoire induite par un dommage tissulaire local est initiée par la relâche de TNF- α et d'IL-1 β (par les monocytes et macrophages) qui agissent sur les cellules somatiques pour stimuler d'avantage la relâche d'IL-1 et d'IL-6 (Baumann H et Gauldie J, 1994). Lors d'une réaction inflammatoire initiée à un site éloigné du foie, l'IL-6 atteint des concentrations plus élevées dans l'entourage des hépatocytes, expliquant ainsi ses effets plus prononcés (Lowry SF, 1993). L'abolition de la sécrétion de protéines de la phase aiguë chez des souris transgéniques déficientes en IL-6 et IL-1 β (l'IL-1 β étant nécessaire à la production de l'IL-6) milite en faveur d'un rôle essentiel de ces cytokines lors d'une réaction inflammatoire causée par la térébenthine (Fantuzzi G et Dinarello CA, 1996). La réduction des niveaux d'ARNm des CYP1A2, CYP2A5 et CYP3A11 durant une RIA est abolie chez les souris déficientes en IL-6, confirmant que cette dernière est indispensable dans la régulation négative du P450 durant l'inflammation aseptique (Siewert E et coll., 2000).

Nos résultats n'excluent toutefois pas un rôle du TNF- α dans la régulation négative d'autres isoformes du P450 *in vivo* puisque cette cytokine est nécessaire pour promouvoir la sécrétion d'IL-6 (Luheshi GN et coll., 1997). L'ensemble de nos résultats et de ceux d'autres équipes suggèrent qu'outre le rôle bien connu de l'IL-6 dans une RIA – c'est-à-dire l'induction de la synthèse de protéines de la phase aiguë, l'apparition des symptômes de la maladie et la répression de la synthèse de l'albumine – l'IL-6 est capable d'inhiber l'activité et de réprimer le P450.

Dans notre modèle humain d'infection virale, l'IFN- γ , l'IL-6 et l'IL-1 β sont responsables de la diminution de l'activité du P450 total, alors que l'IFN- γ , l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α participent à la régulation négative de différentes isoformes du P450. De ces quatre cytokines, l'IFN- γ présente la plus grande efficacité à réduire l'activité du P450, supportant le rôle prédominant de l'IFN- γ dans l'infection virale. Confirmant ces effets, des études chez l'humain ont montré que l'augmentation de la concentration plasmatique de l'IFN- γ dans l'influenza est associée à une réduction de la clairance de l'antipyrine (Brockmeyer NH et coll., 1998). Rappelons que la maladie grippale entraîne également *in vivo* une baisse de la biotransformation de la théophylline, et cette baisse est en corrélation avec la baisse du P450 total observée dans notre modèle *in vitro* (Bleau AM et coll., 2001). *In vivo*, les agents inducteurs de l'IFN- γ diminuent la quantité et l'activité de différentes isoformes du P450: ils réduisent la N-déméthylation de l'éthylmorphine, l'hydroxylation des arylhydrocarbures, la O-dééthylation de l'éthoxy-7 coumarine, la déméthylation de l'érythromycine et la quantité des CYP1A1/A2, CYP2B, CYP2C, CYP3A et CYP2E1 (Delaporte E et coll., 1993; Delaporte E et Renton KW, 1997; Morgan ET, 1997). Une autre étude a démontré que l'IFN- γ abaisse les ARNm des

CYP1A2 et CYP2E1 et l'activité de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase, sans produire d'effet sur le CYP3A et l'ARNm de l'époxyde hydrolase (Abdel-Razzak Z et coll., 1993).

En plus de l'IFN- γ , l'implication d'autres médiateurs dans notre modèle, tels l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , est corroborée par les résultats obtenus suite à l'ajout de cytokines recombinantes dans plusieurs études effectuées chez l'humain, le rat et la souris (Chen JQ et coll., 1995; Clark MA et coll., 1995; Morgan ET, 1997; Parmentier JH et coll., 1997); un résumé de ces effets figure au tableau 4.2 de l'introduction. Par exemple, l'IL-6 et le TNF- α sont équipotents pour réprimer les CYP1A1/A2 dans les hépatocytes humains, toutefois le CYP3A est réprimé d'avantage par l'IL-6 que par les autres cytokines testées (Abdel-Razzak Z et coll., 1993). Dans des cultures d'hépatocytes humains, il a également été montré que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α sont les plus puissants répresseurs des CYP1A1/A2, CYP2B1, CYP2C, CYP2E1, CYP3A, de l'activité de l'époxyde hydrolase et de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (Abdel-Razzak Z et coll., 1993; Muntané-Relat J et coll., 1995). Dans la majorité des études, on rapporte que la baisse du niveau d'ARNm d'une isoforme particulière explique la baisse en quantité de la protéine correspondante. Ce phénomène se traduit par une diminution proportionnelle de l'activité des isoformes du P450 (Morgan ET, 1997).

Les facteurs humoraux et types cellulaires impliqués dans la régulation négative du cytochrome P450

Les cytokines: utilisation de souris knock-out

Une approche moléculaire pour déduire le rôle de médiateurs spécifiques dans la répression du P450 consiste à utiliser des souris knock-out, i.e. porteuses d'un gène

invalidé. Cette méthode a toutefois fourni des résultats controversés. Contrastant avec l'effet attendu, l'injection de LPS à des souris rendues déficientes en récepteur au TNF- α (p55/p75) cause une baisse des CYP1A, 2B, 3A et 4A microsomaux similaire à celle observée chez les souris de type sauvage (Warren GW et coll., 1999). Un résultat négatif analogue a été obtenu chez des souris déficientes en IL-6 où l'administration de LPS a supprimé les ARNm des CYP1A2, 2A5, 2E1 et 3A11 (Siewert E et coll., 2000). Au premier abord, ces résultats voudraient dire que ni le TNF- α ni l'IL-6 ne sont impliqués dans les effets du LPS. Cependant, et comme observé lors de l'invalidation d'autres gènes, ces résultats pourraient indiquer une redondance des signaux: l'absence d'IL-6 ou du TNF- α serait compensée par la production d'autres types de cytokines exerçant des effets similaires. Une autre explication, toute différente, se dégage de travaux récents. Le récepteur au LPS – le CD14 – a récemment été identifié à la surface cellulaire des hépatocytes (Liu S et coll., 1998). Le LPS pourrait donc agir directement sur le foie pour moduler l'expression d'isoformes du P450. En accord avec cette explication, l'équipe de Panesar a montré que l'injection de LPS exerce un effet direct sur l'expression du CYP2C11, de la NOS2 et des protéines de la phase aiguë (Panesar N et coll., 1999). Notons que les cytokines pourraient amplifier la réponse au LPS en stimulant l'expression du CD14; or ce rôle n'est pas obligatoire, d'où les résultats négatifs chez les souris knock-out.

Dans le modèle d'inflammation à la térébenthine, il a été démontré que l'invalidation du gène de l'IL-6 empêche la suppression des CYP1A2, 2A5 et 3A11 chez la souris (Siewert E et coll., 2000). Contrairement à l'inflammation produite par le LPS, la production de protéines de la phase aiguë induite par l'injection s.c. de térébenthine, une inflammation aseptique, est stimulée principalement par l'IL-6 (Siewert E et coll.,

2000). De plus, l'IL-6 est essentielle pour l'apparition de plusieurs symptômes reliés à l'inflammation aseptique (Kozak W et coll., 1997). L'utilisation de souris déficientes pour ces gènes demeure très utile pour déterminer le rôle de différents médiateurs dans différents modèles d'inflammation ; il faut cependant exercer une grande prudence dans l'interprétation des résultats étant donné la possibilité d'effets sur l'expression d'autres gènes.

Les hormones

Bien que les cytokines soient les facteurs majeurs impliqués dans la répression et l'inactivation du P450 lors de l'inflammation, il est important de souligner qu'un stimulus inflammatoire provoque un stress impliquant des changements dans les taux circulants de plusieurs hormones, telles que les glucocorticoïdes, la noradrénaline et le glucagon, qui sont toutes aptes à influencer l'expression du P450. Ainsi, les glucocorticoïdes exercent un effet bimodal sur le P450: à faibles concentrations (état normal) ils induisent le CYP2C11, mais le suppriment à fortes doses (état de stress) (Morgan ET, 1997). Les récepteurs au glucagon et à la noradrénaline dans le foie sont couplés à l'activation de l'adénylate cyclase, et l'AMPc inhibe l'induction au phénobarbital des CYP2B1 et 3A. Le lien entre ces deux observations a récemment été réalisé par la démonstration que le glucagon, via l'AMPc, inhibe l'expression de l'ARNm du CYP2C11 (Sidhu JS et Omiecinski CJ, 1995).

Il est bien établi que l'expression du cytochrome P450 répond de manière sensible au profil temporel de l'hormone de croissance dans le sang (Shapiro BH et coll., 1995). Cependant, le LPS provoque chez les rats normaux le même degré de suppression des CYP2C6, 2C7, 2C12 et 2E1 que chez les rats hypophysectomisés, recevant ou non un

supplément d'hormone de croissance (Morgan ET, 1993). Ce résultat suggère que la régulation négative du P450 ne résulterait pas de l'altération de la sécrétion d'hormone de croissance, du moins dans ce modèle particulier. De toute évidence, des recherches approfondies s'imposent afin de mieux définir la contribution de ces hormones dans le contrôle du P450 lors d'une inflammation.

L'alimentation

Un facteur largement étudié concerne la diminution de la prise de nourriture qui survient dans certains modèles d'inflammation. Des études récentes chez le rat et la souris ont montré qu'en conditions aiguës, l'hypophagie n'est pas un facteur majeur dans la réduction du P450 (Barclay TB et coll., 1999; Mitchell SR et coll., 2001). Étant donné les courtes périodes sur lesquelles notre expérimentation a porté, l'hypophagie ne représente donc pas une variable confondante dont il faille tenir compte dans nos deux modèles d'inflammation. Notons cependant que toute étude s'intéressant aux effets de l'inflammation chronique sur l'expression du P450 devrait contrôler ce biais possible.

Le rôle des cellules de Kupffer

En réponse aux stimuli inflammatoires, les cellules de Kupffer – les macrophages résidents du foie – produisent le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et le TGF- β ; ces cellules représentent donc une source potentielle de cytokines capables d'exercer un effet sur les hépatocytes. Dans une étude comparant la réponse d'hépatocytes mis en culture seuls ou en présence des cellules de Kupffer, il a été démontré que la suppression de l'induction de l'ARNm du CYP2B1 par le LPS implique, comme médiateur, le TNF- α relâché par les cellules de Kupffer. (Milosevic N et coll., 1999). Cependant, étant donné la présence de

récepteurs au LPS sur les hépatocytes, une action directe du LPS sur le P450 demeure une possibilité.

Il est à noter que dans notre méthode d'isolation des hépatocytes, les cellules de Kupffer ne sont pas présentes lors de la mise en culture. Ceci sous-tend une action directe des médiateurs sériques sur les hépatocytes, et non via la stimulation des cellules de Kupffer. La détermination du rôle exact des cellules de Kupffer dans la régulation négative du P450 lors de l'inflammation nécessitera toutefois des expériences plus poussées.

Les voies de signalisation pouvant mener à la diminution d'activité et à la régulation négative du cytochrome P450 par les cytokines

Les voies de transduction du signal par l'IL-6, l'IL-1 β , l'IFN- γ et le TNF- α .

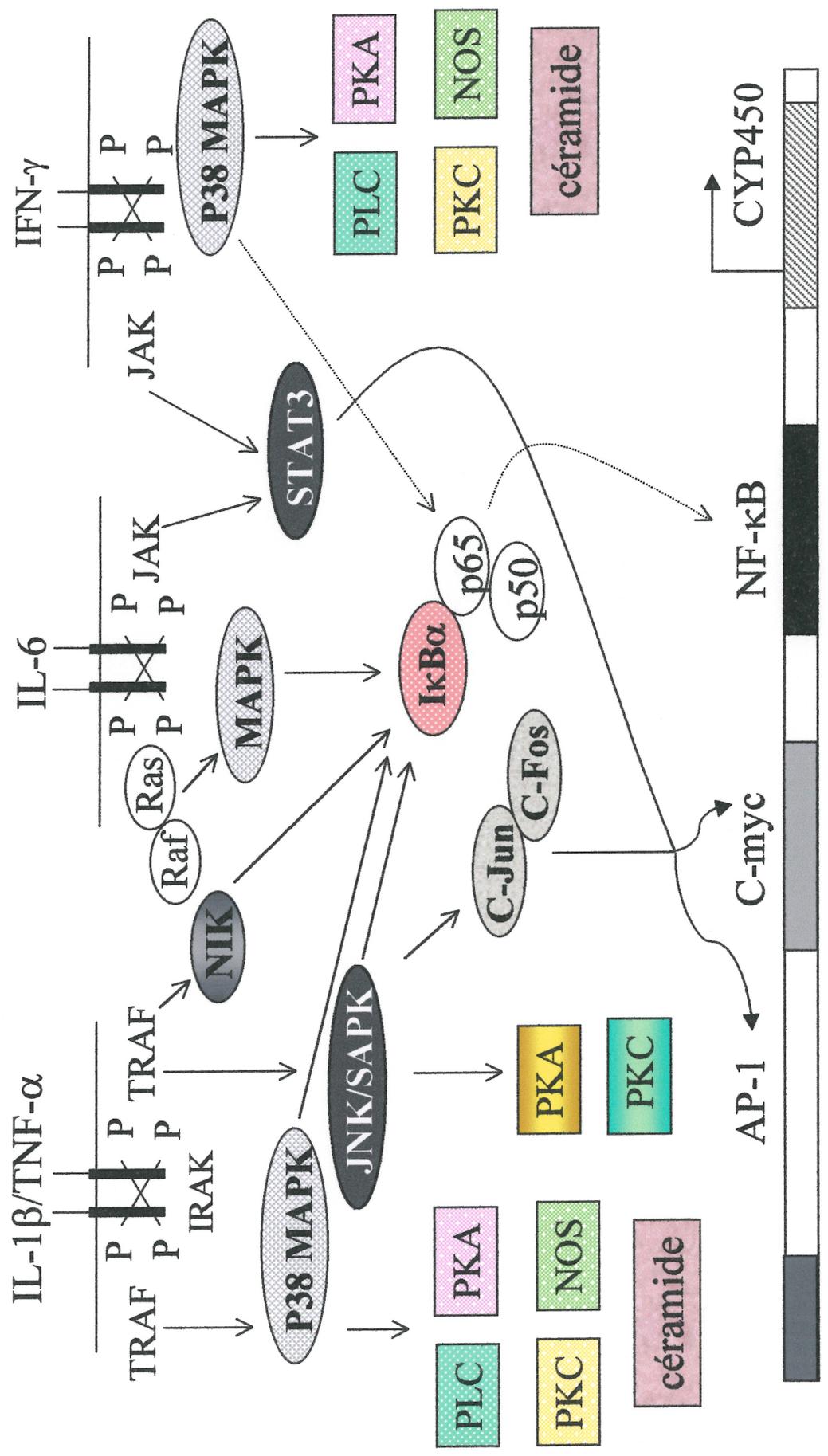
In vivo, la réaction inflammatoire aiguë induite par la térébenthine entraîne la relâche d'IL-6, d'IL-1 β , et de TNF- α , et une infection virale de l'IFN- γ , l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α ; ces cytokines sont celles impliquées dans l'inhibition de l'activité et/ou la régulation négative du P450 (Watkins LR et coll., 1995; Konstantinos AP et Sheridan JF, 2001). Les mécanismes par lesquels les cytokines causent la baisse du P450 dans les hépatocytes font présentement l'objet d'intenses recherches. De façon générale, la liaison d'une cytokine à son récepteur spécifique entraîne l'activation de plusieurs protéines impliquées dans les voies de transduction du signal, dont certains facteurs de transcription

susceptibles de modifier directement l'expression de gènes spécifiques. L'activation et/ou l'inhibition de la phosphorylation de protéines via les cytokines représente un autre mécanisme possible de régulation. Un schéma des voies de signalisation empruntées par les cytokines est illustré dans la figure 8.1.

Sur les cellules cibles, l'IL-6 se lie de façon spécifique à son récepteur transmembranaire – la gp80 ou IL-6R –, ceci déclenche l'homodimérisation de la gp130 et l'activation la protéine associée Janus tyrosine kinase (JAKs). Cette dernière active, par une phosphorylation sur des résidus de tyrosine, le transducteur de signal et activateur de transcription 3 (STAT3), qui augmente la transcription de gènes codant pour les protéines plasmatiques de la phase aiguë (PPA) ainsi que l'expression de *c-myc*. Par contre, l'IL-6 peut activer la cascade des MAPK, et ainsi modérer la production des PPA et augmenter l'expression du facteur nucléaire-kappa B (NF- κ B) (Hirano T, 1998).

L'IFN- γ active la protéine tyrosine kinase (PTK) de la famille des JAK/STAT, entraînant une surexpression de *c-myc*. De plus, l'IFN- γ induit la production de céramides et de la protéine p38-MAPK, un membre de la famille des MAPK, qui active le NF- κ B (Platanias LC et Fish EN, 1999). L'induction de la NO synthase 2 (NOS2) par l'IFN- γ fait appel à la PTK et à l'activation de la PKC comme intermédiaires (Sales ME et coll., 1999). L'IL-1 β active une cascade de voies de signalisation, telles que les protéines kinases activées par le stress/kinase c-Jun (SAPK/JNK) et p38-MAPK, lesquels activent NF- κ B. L'IL-1 β active la protéine kinase A dépendante de l'AMPc (PKA), la PKC et la PTK. Elle augmente aussi l'expression de *c-myc* et du niveau de céramides (Auron PE, 1998). Le TNF- α active plusieurs types de MAPK comme le SAPK/JNK et p38-MAPK, PKC et PTK, et augmente l'expression de *c-myc* et NF- κ B (Baud V et Karin M, 2001).

Figure 8.1
Voies de transduction du signal par les cytokines



Chacune de ces voies de signalisation s'avère un mécanisme possible pouvant mener à la diminution du P450. Certaines sont plus spécifiques à une cytokine donnée: par exemple l'IL-6 et l'IFN- γ semblent activer préférentiellement la phosphorylation des résidus de tyrosine alors que l'IL-1 β et le TNF- α favorisent la phosphorylation des résidus de sérine et thréonine. Un chevauchement dans les voies de signalisation entre les cytokines peut survenir: l'IL-6, l'IL-1 β , l'IFN- γ et le TNF- α ont en commun l'activation de MAPK, PKC, PTK, c-myc et NF- κ B; l'IFN- γ et l'IL-1 β activent la voie des SAPK/JNK MAPK; et une interaction entre l'IL-6 et l'IFN- γ existe également via la voie commune des JAK/STAT; une interaction a aussi été décrite entre l'IFN- γ et le TNF- α (Bankers-Fulbright JL et coll., 1996; Sengupta TK et coll., 1996a; Paludan SR, 2000).

Nos travaux sur la neutralisation de l'activité des cytokines dans le sérum suggèrent des voies de signalisation communes empruntées par les cytokines pour la réduction de l'activité et la répression du P450. En effet, en bloquant séparément l'activité de cytokines spécifiques, chaque neutralisation provoque un recouvrement de 80 à 95% du P450 initial, suggérant un effet non additif et donc un chevauchement entre les voies. Toutefois, selon l'isoforme testée, un effet additif entre cytokines pourrait contribuer à la régulation négative du P450. Dans les travaux futurs, il s'avèrera donc important de cibler les voies impliquées.

Le rôle des protéines kinases dans la diminution d'activité et la régulation négative du cytochrome P450 par les cytokines.

Tel que noté plus haut, la régulation des expressions constitutive et inductible des isoformes du P450 en regard de la biotransformation des médicaments soulève de multiples questions. Plusieurs données expérimentales suggèrent l'implication de protéines kinases dans la répression et la réduction d'activité du P450. Le tableau 8.1A résume les connaissances sur ce sujet. De plus, des données *in vitro* montrent que l'effet des cytokines sur le P450, aux niveaux génique et protéique, implique des protéines kinases.

Dans notre laboratoire, nous avons montré que la phlorétine (dépléteur de l'ATP cellulaire), l' amino-2 purine (inhibiteur non sélectif de la sérine-thréonine kinase), le bis-indolmaléimide (inhibiteur de la protéine kinase C - PKC) et le PD98059 (inhibiteur des MAPK) préviennent la diminution du P450 total induite par le sérum de lapins et d'humains avec une réaction inflammatoire. Ceci suggère que la diminution d'activité du P450 soit associée à l'activation de la voie de signalisation dépendante des MAPK et PKC (Levithchi M. et coll., manuscrit en préparation). Cette observation peut s'expliquer par le fait que la voie des MAPKs et de la PKC, ou comme alternative la voie MAPK dépendante de la PKC, sont des voies de signalisation communes à l'IL-6, l'IFN- γ et l'IL-1 β , ces cytokines étant les médiateurs responsables de la diminution d'activité du P450 (Doanes AM et coll., 1999; Bleau AM et coll., 2000). Cependant, ces résultats suggèrent aussi que les CYP1A1 et 1A2 ne soient pas affectés par les sérine-thréonine kinases puisque l' amino-2 purine ne rétablit pas le métabolisme de la théophylline après exposition au sérum. Quant à l'activité du CYP3A6, les quatre inhibiteurs préviennent la réduction d'activité, avec des efficacités différentes, suggérant que les MAPK et la PKC

sont impliquées dans la réduction de l'activité de cette isoforme (Levithchi M. et coll., manuscrit en préparation).

La phosphorylation directe de protéines constitue un mécanisme plausible pour expliquer la diminution d'activité du P450 par les kinases (Oesch-Bartlomowicz B et Oesch F, 1990). *In vitro*, les CYP2B1/2, 2C2 et 3A1 peuvent être phosphorylés sur des résidus sérine et thréonine par la PKA et la PKC avec perte de leur activité catalytique (Bartlomowicz B et coll., 1989; Eliasson E et coll., 1994; Moritz KU et coll., 1998). Les différentes isoformes du P450 ne présentent toutefois pas la même sensibilité à la phosphorylation: par exemple, les CYP1A1 et 1A2 ne seraient pas phosphorylés par la PKA ou la PKC, alors que la phosphorylation post-traductionnelle s'avère un mécanisme important dans la régulation des isoenzymes de la sous-famille du CYP3A (Oesch-Bartlomowicz B et coll., 1997).

De plus en plus d'études suggèrent un rôle des phosphatases dans la régulation de l'activité et de l'expression du P450. Le niveau d'activité des phosphatases *in vitro* est de 10 à 1000 fois supérieur à celui des PTK. Dans la plupart des cellules, l'activation des récepteurs TK par liaison du ligand n'est pas suffisante à elle seule pour augmenter le niveau basal de phosphorylation de protéines: une inhibition de l'activité des phosphatases serait donc nécessaire (Carballo M et coll., 1999).

Le rôle des SOR dans la diminution d'activité ainsi que la répression du P450 dans l'inflammation.

Plusieurs arguments expérimentaux relient les SOR au contrôle du P450. *i.* La réaction inflammatoire aiguë induite par la térébenthine augmente la concentration de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) dans les microsomes hépatiques. Cet effet s'accompagne d'une diminution de l'activité de la glutathion peroxydase, de la catalase et de la superoxyde dismutase, mais d'une augmentation de l'activité de la xanthine oxydase (Proulx M et du Souich P, 1995b). *ii.* *In vivo*, le traitement de lapins avec le L-NAME avant l'induction d'une réaction inflammatoire prévient partiellement la diminution d'activité du P450 et l'augmentation de la peroxydation des lipides, sans empêcher la régulation négative du P450 (Barakat MM et coll., 2001). *iii.* *In vitro*, l'addition de SOR tels le H₂O₂ et le nitroprussiate de sodium réduit l'activité du P450 de façon dose-dépendante dans des hépatocytes. *iv.* Le L-NAME, la diméthylthiourée (DMTU) et la N-acétylcystéine (NAC) préviennent partiellement la diminution d'activité du P450 ainsi que l'augmentation des TBARS induites par le sérum de lapins et d'humains avec inflammation. *v.* Les inhibiteurs des anti-oxydants potentialisent l'effet du sérum et des SOR: l'ajout de l' amino-3 triazole-1,2,4 (inhibiteur de la catalase), de la DL-buthionine-(SR)-sulphoxamine (inhibiteur de la glutathion peroxydase) et le diéthylthiocarbamate (inhibiteur de la superoxyde dismutase) potentialisent l'effet du sérum (El-Kadi et coll., 2000). Ces résultats indiquent une implication des SOR dans la réduction d'activité et la répression du P450 induites par l'inflammation, toutefois leurs rôles spécifiques restent à définir.

Tableau 8.1

**Voies de transduction du signal menant à la diminution d'activité
et à la régulation négative du cytochrome P450.**

A. Rôle des protéine kinases: réduction du P450

PROTÉINE KINASES	ISOFORMES DE CYP	RÉFÉRENCES
↑ activité des PK phosphorylant des sérines ou thréonines	↓ expression 1A1, 2B10, 3A	Kikuchi H et coll., 1998; Honkakoski P et Negishi M, 1998; Sidhu JS et Omiecinski CJ, 1996
↓ activité PTK et PKA	↑ expression 2B1/2, 2E1, 3A1	Sidhu JS et Omiecinski CJ, 1999; Donato MT et coll., 1998; Sidhu JS et Omiecinski CJ, 1996
↑ activité PTK, PKA et PKC	↑ expression 1A1	Li SY et Dougherty JJ, 1997; Chung I et Bresnick E, 1997
↑ activité PKC	↓ activité 1A1, 2B1	Moritz KU et coll., 1998
↑ activité PTK, PKC, SAPK/JNK et c-myc	↓ expression 2C11, P450 aromatase	Nikolova-Karakashian M et coll., 1997 Santana P et coll., 1995; Chalfant CE et coll., 1999; Sengupta TK et coll., 1996b

B. Rôle des SOR: activation de protéine kinases

SOR	ENZYMES	RÉFÉRENCES
H ₂ O ₂	↑ JAK/STAT	Simon AR et coll., 1998b
H ₂ O ₂	↑ p38-MAPK	Robinson KA et coll., 1999
H ₂ O ₂	↓ tyrosine phosphatases; ↑ STAT3; ↑ ou ↓ NF-κB	Carballo M et coll., 1999.
H ₂ O ₂	↑ SAPKs/JNKs, ERKs1/2, p42/44 MAPK, p38-MAPK, PI-3K, PKC et PKA	Finkel T, 2000; Goldkorn T et coll., 1998; Roberts ML et Cowsert LM, 1998
NO [•]	↑ SAPK/JNK et p38-MAPK: effet bloqué par PKC	Jun CD et coll., 1999
peroxynitrite	↑ p38-MAPK, JNK1/2 et ERK1/2	Schieke SM et coll., 1999.

PK: protéine kinase; PTK: protéine tyrosine kinase; SAPK/JNK: "stress/kinase c-Jun";
MAPK: "mitogen activated protein kinase"; ↓: diminution; ↑: augmentation

Le rôle particulier du NO dans la diminution d'activité et la répression du P450.

Nous avons rapporté que l'exposition des hépatocytes au nitroprussiate de sodium pendant 4 heures diminue l'activité du P450, tel que mis en évidence par une réduction du métabolisme de la théophylline et du P450 total (ensemble des isoformes), sans diminution de la quantité de protéines (El-Kadi et coll., 2000). Le nitroprussiate de sodium génère du NO dont la propriété de radical libre explique son action sur le P450: le NO peut se lier aux hémoprotéines par formation d'un complexe nitrosyl stable avec l'ion ferreux, et de ce fait inhiber l'activité catalytique du P450 (Wink DA et coll., 1993). Dans des microsomes de rats, l'addition de NO en solution cause une inhibition partiellement réversible du P450; la composante irréversible peut être due à la réaction du NO avec des résidus d'acides aminés critiques telle la nitration de résidus tyrosine (Wink DA et coll., 1993; Roberts ES et coll., 1998).

Dans le sommaire d'un symposium récent, on souligne que différentes équipes ont rapporté des résultats contradictoires quant à l'implication du NO dans la régulation négative du P450 (Morgan ET et coll., 2001). Supportant un rôle du NO dans la suppression du P450, quelques laboratoires ont montré que l'inhibition de la NOS atténue la baisse de l'activité, du niveau d'ARNm et de protéines des isoformes du P450 (Carlson TJ et Billings RE, 1996; Khatsenko et Kikkawa, 1997; pour une revue de la littérature voir Morgan ET, 1997). Cependant, d'autres études ont rapporté que la génération de NO ne serait pas nécessaire à la suppression du P450; l'utilisation d'inhibiteurs de la NOS en culture primaire et de souris déficientes pour le gène de la NOSi n'a pas réussi à mettre en évidence le rôle du NO (Hodgson PD et Renton KW, 1995; Sewer MB et coll., 1997, Sewer MB et Morgan ET, 1998). Un consensus demeure néanmoins pour un rôle du NO dans la diminution de l'activité du P450 lors de l'inflammation. Par exemple, dans des

cultures d'hépatocytes de rat, l'IL-1 β , le TNF- α , l'IFN- γ et le LPS diminuent l'activité des CYP1A1/2, effet partiellement bloqué par un inhibiteur de la NOS (Stadler J et coll., 1994; Morgan ET et coll., 2001).

Il est bien établi que l'injection de LPS cause une baisse de la quantité de protéine du CYP2B1 induit; des résultats récents indiquent que cette baisse est dépendante du NO. L'élucidation des mécanismes d'action du LPS permet de mieux appréhender les résultats en apparence contradictoires quant au rôle du NO. Ainsi, à fortes doses, le LPS cause une diminution rapide de la quantité de protéine du CYP2B1, possiblement par une dégradation NO-dépendante de la protéine. De manière différente, de faibles doses de LPS entraînent une répression lente de l'ARNm du CYP2B1 (et de la protéine correspondante), mais cet effet sur l'ARNm ne serait pas NO-dépendant. (Ferrari L et coll., 2001; Morgan ET et coll., 2001).

En résumé, il est clair que le NO, produit par la NOSi des hépatocytes, a le potentiel d'inhiber le cytochrome P450 hépatique et de contribuer substantiellement à la diminution de l'activité catalytique observée durant l'inflammation. Ceci peut se démontrer par ajout direct de NO, de LPS ou de cytokines. Cependant, il appert que le NO ne soit pas requis pour la répression du niveau de l'ARNm du P450.

Les voies de transduction du signal par les SOR menant à la diminution de l'activité et à la répression du P450 induites par l'inflammation.

D'une part, l'IL-6, l'IFN- γ , l'IL-1 β et le TNF- α promouvoient la formation de SOR tels le H₂O₂, le NO \cdot , le OH \cdot et le \cdot O₂⁻. D'autre part, on sait que les effets des cytokines pro-inflammatoires peuvent résulter de l'action des céramides et des SOR (Medvedev AE et coll., 1999; Fuchs J et coll., 2001). De plus en plus d'études suggèrent

donc que les SOR soient des composantes intégrales de la signalisation par les cytokines agissant via leurs récepteurs membranaires. Ainsi les SOR peuvent augmenter l'activité de protéine kinases reconnues comme composantes des voies de signalisation empruntées par les cytokines. Le tableau 8.1B présente une compilation des données de littérature.

Les travaux réalisés dans notre laboratoire ont démontré que la pré-incubation avec la phlorétine, l' amino-2 purine, le bis-indolmaléimide et le PD98059 empêche la diminution de l'activité du P450 dans les hépatocytes exposés au sérum provenant de sujets avec inflammation. Nous avons par ailleurs observé que les SOR sont impliqués dans la diminution de l'activité du P450 produite par le sérum de sujets avec une inflammation d'origine virale (El-Kadi et al., 2000). Ces résultats permettent de déduire que la diminution d'activité du P450 serait reliée à l'activation de la voie de signalisation dépendante des MAPK et PKC, processus dans lequel les SOR seraient les effecteurs terminaux.

En résumé, les SOR peuvent affecter l'activité et la quantité des isoformes du P450 de plusieurs manières : *i.* les SOR peuvent constituer une étape essentielle dans l'activation de la phosphorylation des CYP1A, 2B1/2, 2B4, 2E1 et 3A, et donc diminuer leur activité catalytique; *ii.* les SOR peuvent affecter les isoformes du P450 directement ou réduire leur activité; et *iii.* les SOR peuvent réguler négativement le P450 en modulant l'expression de facteurs de transcription tels NF- κ B et c-myc (Karuzina II et Archakov AI, 1994; Quillet-Mary A et coll., 1997; Flescher E et coll., 1998; Oesch-Bartlomowicz B et coll., 1998; Korsmeyer KK et coll., 1999). En d'autres termes, les SOR peuvent agir soit comme messagers dans la cascade qui mène à la réduction d'activité et/ou la répression du P450, ou soit en affectant directement les isoformes du P450.

Les mécanismes de génération des SOR

La source des SOR responsables de la réduction du P450 demeure mal caractérisée. Les sources potentielles sont la NADPH oxydase cytosolique et membranaire, la xanthine oxydase (XO) et la chaîne respiratoire mitochondriale. On sait que l'IL-6, l'IL-1 β , le TNF- α et l'IFN- γ activent la phospholipase A2 (PLA2) pour générer l'acide arachidonique (AA) qui est transformée en leucotriènes (LC) et en SOR par la 5-lipoxygénase (Andreani M et coll., 2000). À leur tour, l'AA et les LC peuvent activer la NADPH oxydase cytosolique et membranaire (Ponzoni M et Cornaglia-Ferraris P, 1993). L'IL-6 et l'IL-1 β ont un effet préférentiel sur la forme sécrétée de la PLA2 (PLA2s), et l'INF- γ sur la PLA2 cytosolique (PLA2c); l'IFN- γ peut également activer la PLD (Li W et coll., 1999; Wu T et coll., 1994). D'autre part, la PLA2 et la PLD peuvent générer des médiateurs lipidiques: l'AA, le diacyl-1,2 glycérol et l'acide phosphatidique, lesquels peuvent activer la NADPH oxydase et entraîner la formation de O $_2^{\cdot-}$ ou de H $_2$ O $_2$ (Erickson RW et coll., 1999).

La figure 8.2 présente un schéma général des différentes voies de signalisation empruntées par les cytokines, et la source des SOR pouvant mener à la baisse du P450 hépatique.

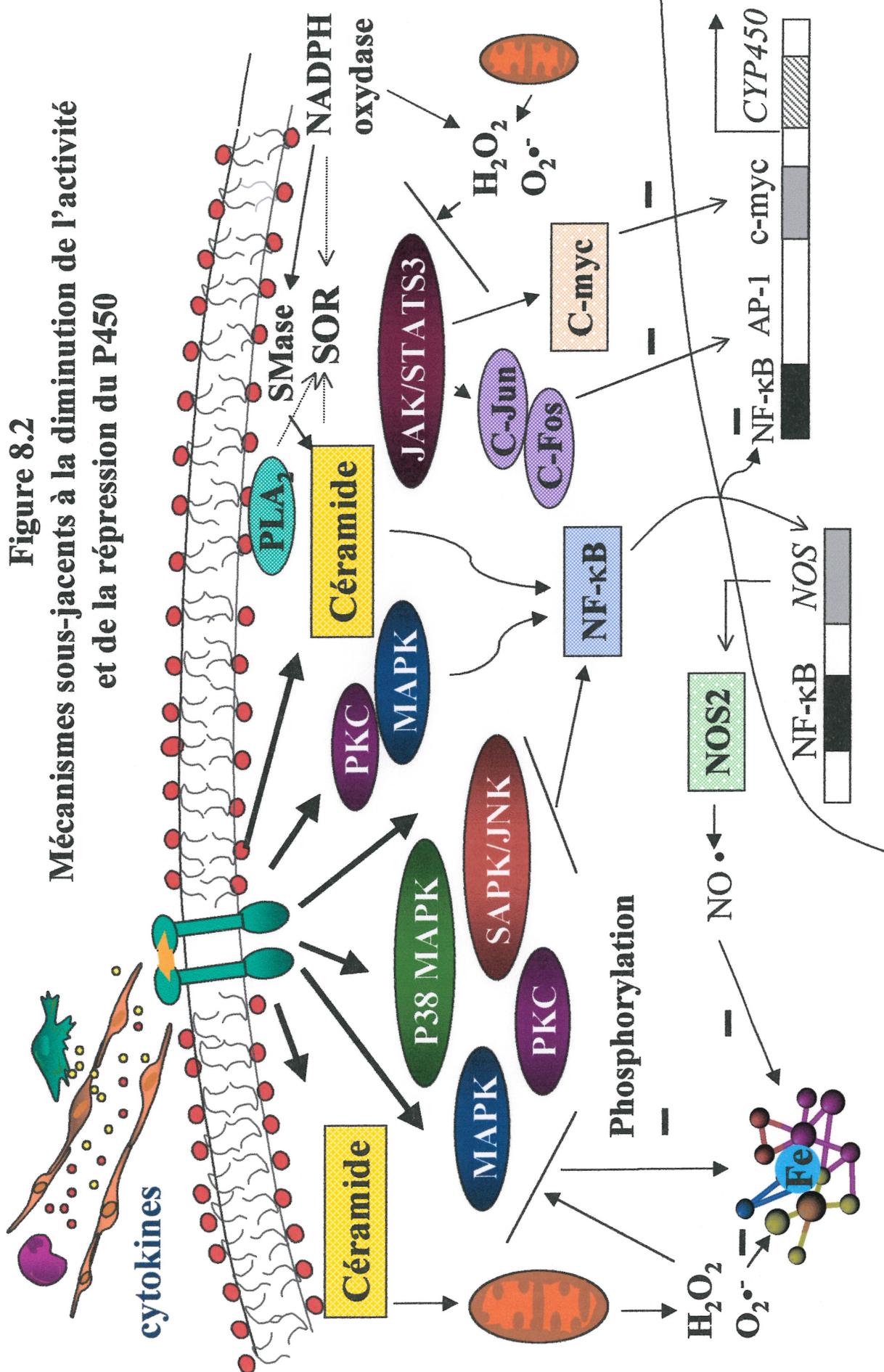


Figure 8.2
Mécanismes sous-jacents à la diminution de l'activité
et de la répression du P450

Les facteurs de transcription et récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation négative du cytochrome P450

L'expression des isoformes du P450 dans le foie est étroitement régulée par différents facteurs de transcription, et le processus inflammatoire peut y interférer à plusieurs niveaux.

Tel que décrit précédemment, les cytokines peuvent agir sur l'expression basale, c'est-à-dire l'expression constitutive des isoformes du P450, ou sur l'induction afin de prévenir l'augmentation de leur expression. Deux mécanismes ont été proposés afin d'expliquer la répression, par les cytokines, du CYP1A1 induit. Premièrement, les cytokines peuvent moduler l'induction par un effet sur le récepteur Ah, se traduisant par une diminution de l'expression (Honkakoski P et Negishi M, 2000). Par exemple, le AhR peut interagir avec le NF- κ B induit par l'inflammation avec comme conséquence une répression mutuelle (Tian Y et coll., 1999). Deuxièmement, le gène du CYP1A1 est réprimé par des stimuli oxydatifs via une modulation de la liaison du facteur nucléaire-1 (NF-1) au promoteur. La suppression de l'activité du promoteur du CYP1A1 par le TNF- α et le H₂O₂ est dépendante du site de liaison du NF-1 et le traitement par l'antioxydant dithiocarbamate de pyrrolidine inhibe l'effet du TNF- α , suggérant que la régulation du NF-1 s'effectue via un effet rédox (Morel Y et Barouki R, 1998). Finalement, le H₂O₂ induit par le NF- κ B est capable de diminuer le nombre de AhR cytosoliques.

Le NF- κ B est un facteur de transcription impliqué dans la régulation immédiate de l'expression de gènes précoces; il joue un rôle majeur durant l'inflammation, principalement en aval des kinases activées par la liaison des cytokines à leurs récepteurs. La forme la plus commune du NF- κ B est le dimère p50/p65 – dont la sous-unité p65

confère la forte activité de transactivation – qui demeure séquestré dans le cytoplasme par sa liaison à la protéine I κ B. Un stimulus inflammatoire produit une phosphorylation de I κ B, puis sa dégradation. Le dimère est donc libre de transloquer au noyau pour se lier à des séquences spécifiques de l'ADN et moduler l'expression de différents gènes. Alors que NF- κ B est reconnu pour stimuler la transcription, l'effet contraire a été observé dans le cas de deux isoformes du P450. Par exemple, le promoteur du CYP2C11 contient un site de liaison de faible affinité pour le NF- κ B; une mutation dans le promoteur bloquant la liaison du NF- κ B abolit la suppression de la transcription du CYP2C11 par l'IL-1 β et le LPS (Iber H et coll., 2000). Le NF- κ B peut également contribuer à la diminution de l'induction du CYP1A1 par le TCDD via une interaction avec le récepteur AhR (Tian Y et coll., 1999). Selon ces auteurs, le mécanisme de répression mutuelle du gène du CYP1A1 par l'interaction AhR et NF- κ B demeure incertain.

Le proto-oncogène *c-myc* code pour un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire et susceptible d'influencer l'expression de plusieurs gènes; il joue également un rôle important dans la réponse inflammatoire et semble impliqué dans la régulation de l'expression du P450. Effectivement, plusieurs inhibiteurs de la transcription de *c-myc* bloquent la répression des CYP2C11 et 3A induite par l'IL-2 chez le rat (Tinel et coll., 1999). *c-fos* et *c-jun* représentent d'autres facteurs de transcription jouant un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire en réponse au stress oxydatif et aux stimuli inflammatoires. De plus, ils font partie intégrante de la voie de transduction du signal par les cytokines via l'activation des protéines JAK/STATS et peuvent donc contribuer à la répression du P450 lors de l'inflammation (Guha M et Mackman N, 2001).

Les facteurs de transcription c-Myc et NF- κ B sont des composantes de la voie de signalisation des cytokines; il a également été rapporté que les SOR produits durant l'inflammation peuvent servir de second messenger afin d'augmenter l'expression de c-myc et activer NF- κ B via les céramides (Clerk A et coll., 1998; Simon AR et coll., 1998a). Puisque l'inflammation induite par la térébenthine active à la fois c-Myc et NF- κ B, la surexpression de ces protéines pourrait être associée à la régulation négative du P450 observée dans ce modèle d'inflammation (Kim et Baumann, 1999; Wang Y et coll., 1999).

Les facteurs de transcription enrichis hépatiques

Les facteurs de transcription enrichis dans le foie pourraient également participer à dans la répression du P450. En effet, l'exposition de cellules HepG2 (transfectées avec HNF-4) au TNF- α mène à la répression du CYP7A1 via la liaison du HNF-4 à l'élément de réponse aux acide biliaires (De Fabiani E et coll., 2001). Il n'est pas exclu que cette observation puisse s'appliquer à la répression du P450 lors de l'inflammation.

La transfection de cellules HepG2 avec un vecteur d'expression du C/EBP α a montré que ce facteur peut influencer positivement l'expression de certaines isoformes du P450, dont celles de la sous-famille du CYP2 (Jover R et coll., 1998). Le C/EBP α pourrait contribuer à la diminution du P450 lors de la réponse inflammatoire car durant l'induction des protéines de la phase aiguë, l'IL-6 entraîne une diminution du C/EBP α et une induction de C/EBP β dans les hépatocytes. L'induction de C/EBP β et de C/EBP δ par l'IL-6 et d'autres cytokines est un des mécanismes d'augmentation des protéines de la phase aiguë (Morgan ET et coll., 1998).

Le rôle des récepteurs orphelins dans la régulation négative du cytochrome P450

Les récepteurs orphelins de la famille des récepteurs nucléaires (CAR, PXR et PPAR- α) peuvent interagir avec d'autres récepteurs nucléaires (formation d'hétérodimères) et avec une variété de voies de signalisation intracellulaires, incluant celles activées par les cytokines et facteurs de croissance.

L'action de l'IL-6 sur les hépatocytes humains en culture primaire revêt ici un intérêt particulier. Cette cytokine réprime l'expression du PXR et du CAR, sans affecter les niveaux d'ARNm d'autres récepteurs nucléaires. Dans les mêmes cellules, l'IL-6 atténue l'effet inducteur, par exemple celui de la rifampicine sur le CYP3A4. Puisque l'activité transcriptionnelle intrinsèque du PXR et du CAR n'est pas affectée par l'IL-6, les auteurs invoquent une régulation négative de ces gènes pour expliquer l'atténuation de l'induction du CYP3A4 (Pascussi JM et coll., 2000).

Il a été proposé que la diminution de l'expression des récepteurs nucléaires PXR et CAR et du gène du CYP3A par l'IL-6 se fait via l'activation des JAK/STATS, du NF- κ B ou du AP-1, (Pascussi JM et coll., 2000). Le PPAR- α est activé par l'inflammation secondaire au LPS. Comparativement aux souris de la souche sauvage, la déficience en gène du PPAR- α chez des souris transgéniques homozygotes bloque ou atténue la répression des CYP2A5, 2C29 et 3A11 provoquée par l'injection de LPS. Une des hypothèses pour expliquer le rôle du PPAR α dans la réduction du P450 lors de l'inflammation implique la relâche d'un ligand pour le PPAR α avec augmentation de son activité transcriptionnelle, avec comme résultat la répression du P450 (Barclay TB et coll., 1999).

Les états pathologiques et la régulation du cytochrome P450

Outre l'inflammation et l'infection, plusieurs états pathologiques comme le cancer, l'insuffisance rénale et l'hypoxie sont susceptibles d'influencer le métabolisme des médicaments. L'étude des effets de ces maladies sur le P450 permet de mieux comprendre les mécanismes et facteurs susceptibles de réguler l'expression de différentes isoformes du P450. Ainsi, l'addition du sérum de patients avec cancer à des hépatocytes en culture réduit le contenu total en P450 et le métabolisme de la testostérone (Grant MH et coll., 2001). Une analyse du contenu hépatique en CYP27A – la 25-stérol hydroxylase impliquée dans l'activation de la vitamine D – a permis d'identifier un patient, atteint d'un carcinome hépatique, chez qui cette isoforme était augmentée par un facteur de 1000, avec pour conséquence une concentration plasmatique beaucoup plus élevée de la 25-hydroxyvitamine D (Gascon-Barré M et coll., 2001). Chez le rat atteint d'une insuffisance rénale, le contenu total en P450, la N-déméthylation de l'érythromycine et les concentrations d'ARNm des CYP2C11, 3A1 et 3A2 et des apoprotéines correspondantes sont tous diminués (Leblond F et coll., 2001). De plus, le sérum des rats avec insuffisance rénale reproduit les effets observés *in vivo* (Guévin C, communication personnelle).

Notre laboratoire a récemment entrepris l'étude des mécanismes impliqués dans l'effet de l'hypoxie sur le P450: nous discuterons donc en détail de ce sujet, en parallèle avec l'inflammation. Chez le lapin, l'hypoxie entraîne une réduction des niveaux d'ARNm et de protéine des CYP1A1 et 1A2, qui se traduit par une réduction du métabolisme de la théophylline; en revanche, l'hypoxie est associée à une augmentation de l'expression du CYP3A6 (Kurdi J et coll., 1999). Par immuno-neutralisation de l'activité de différentes cytokines dans le sérum de lapins hypoxiques, nous avons montré

que l'IFN- γ est le médiateur principal impliqué dans la répression des CYP1A1 et 1A2, et que l'érythropoïétine (Epo) est partiellement responsable de l'augmentation du CYP3A6 (Fradette C et coll., article en révision, Br J Pharmacol 2002). De façon générale, plusieurs mécanismes peuvent contribuer à la répression des CYP1A1 et 1A2, le plus important étant une réduction de l'expression via un mécanisme au niveau transcriptionnel (Morgan ET, 1997). Toutefois, l'hypoxie modifie l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines qui favorisent l'approvisionnement des tissus en oxygène, tels la NOS2 ou l'érythropoïétine, ou qui permettent une adaptation du métabolisme cellulaire en condition de faible pO_2 , effet régulé par le HIF-1 ("hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activator"). Le HIF-1 est un hétérodimère composé de la sous-unité HIF-1 α associée au HIF-1 β ou Arnt. HIF-1 β ou Arnt peut former un dimère avec le récepteur AhR. En conditions hypoxiques, HIF-1 β forme un hétérodimère préférentiellement avec HIF-1 α ; l'expression de HIF-1 β étant limitée, HIF-1 α compétitionne avec AhR pour le recrutement de HIF1- β (Whitlock JP, 1999). En conséquence, l'activation de HIF-1 pourrait inhiber la formation de l'hétérodimère AhR-Arnt et diminuer ainsi l'expression du CYP1A1.

Comme mentionné plus haut, l'expression du CYP3A4 est modulée par plusieurs récepteurs nucléaires tels le récepteur constitutif androstane, le PXR, le RXR, HNF-4 et le récepteur aux glucocorticoïdes. Puisque l'hypoxie augmente l'expression de l'Epo via l'activation de RXR et HNF-4 en coopération avec HIF-1 (Kambe T et coll., 2000), on peut spéculer que HIF-1 soit responsable de l'augmentation de l'expression du gène du CYP3A4. L'augmentation de l'expression du CYP3A4 par l'hypoxie suggère un rôle physiopathologique de cette isoforme dans l'hypoxie systémique. Le CYP3A4 est une

source d'agents vasoactifs susceptibles d'augmenter le flot sanguin par conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines et leucotriènes et par la production de NO.

Il est intéressant de constater que *in vivo* chez le lapin, l'effet combiné de l'hypoxie et de la réaction inflammatoire induite par la térébenthine n'est pas additif; l'effet net de la combinaison est même inférieur à celui de chaque condition expérimentale prise indépendamment. La formation du 1,3DMU, un des métabolites de la théophylline produits par les CYP1A1 et 1A2, n'est pas affectée alors que la quantité de protéine diminue. Il est donc possible que l'hypoxie et l'inflammation combinées protègent ou augmentent la teneur d'autres protéines du P450 impliquées dans la formation de ce métabolite (Kurdi J et coll., 1999). La diminution de l'effet par rapport à chaque condition prise isolément peut s'expliquer par la notion que les cellules T sont nécessaires à la répression du P450 induite par l'inflammation, alors que l'hypoxie inhibe la fonction de ces cellules (Meehan RT, 1987; Topfer F et coll., 1995). De plus, l'hypoxie réduit certains médiateurs et mécanismes intracellulaires requis pour la répression du P450 par l'inflammation, tels le TNF- α , l'IL-1 α , l'IL-1 β et le H₂O₂ (Wibbenmeyer LA et coll., 1995; Matuschak GM et coll., 1996). Voilà donc une hypothèse susceptible d'expliquer pourquoi les patients souffrant d'une maladie pulmonaire obstructive chronique ont un métabolisme de la théophylline à peine réduit, et que l'oxygénothérapie n'améliore par le métabolisme (du Souich P et coll., 1989).

La finalité de la régulation négative du cytochrome P450.

Même trente ans après la découverte du phénomène, on se perd toujours en conjectures devant l'avantage que peut représenter pour l'organisme de diminuer, voire abolir, l'expression d'isoformes du P450 lors d'une réaction inflammatoire. Dans sa revue de la littérature, E.T. Morgan réévalue certaines hypothèses et en rapporte de nouvelles à

la lumière de données plus actuelles (Morgan ET, 2001). Cette question méritant un examen attentif, nous reverrons de manière critique les arguments avancés par cet auteur – et par d'autres qui ont contribué aux avancements – et tenterons d'en dégager les éléments les plus porteurs.

Une première hypothèse propose qu'il soit nécessaire de concentrer l'activité transcriptionnelle du foie vers la synthèse de protéines importantes pour la défense de l'organisme et le contrôle de la réaction inflammatoire systémique: les protéines de la phase aiguë. Sans la rejeter, ET Morgan remet en question cette hypothèse sur la base de données qui montrent que les isoenzymes du P450 sont modulées à divers degrés, par diverses cytokines, et selon des voies différentes, notions en apparence incompatibles avec un mécanisme non-spécifique. A notre avis, cette hypothèse – formulée en 1989 – sous-estime la capacité biosynthétique du foie et néglige de prendre en compte que la biosynthèse des isoenzymes du P450 n'occupe qu'une mince fraction de la production protéique totale effectuée par cet organe. Rappelons que le foie produit la quantité phénoménale de 12g/jour d'albumine (Seifter S et Englard S, 1994). Réduire la synthèse d'albumine représente donc une économie majeure en comparaison de la baisse du P450. De surcroît, notre laboratoire a bien démontré qu'en plus de son effet sur l'expression, l'inflammation entraîne une diminution de l'activité catalytique d'enzymes du P450 (Bleau AM et coll., 2001). Il paraît logique de penser que dans sa finalité, la baisse du P450 causée par l'inflammation vise bien plus la perte transitoire d'une fonction que l'arrêt de synthèse pour fins d'économie en protéines.

Une autre théorie met en jeu des SOR, tels le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde, sous-produits du cycle catalytique découplé des isoformes du P450, en particulier du CYP2E1. Des taux élevés de ces substances créent d'une part un stress

oxydatif, et d'autre part peuvent générer le radical hydroxyle hautement réactif. Diminuer la teneur en cytochrome P450 serait donc susceptible de prévenir des dommages aux constituants cellulaires. Les données expérimentales rapportées pour étayer cette hypothèse sont indirectes: « L'induction ou l'expression ectopique de diverses enzymes du P450 a été associée à des marqueurs de dommages oxydatifs dans des cellules en culture » (Dai Y et coll., 1993; Park J. et coll., 1996). Notons que ces deux modèles (induction et expression ectopique) s'éloignent des conditions prévalant *in vivo*, surtout en regard de l'extrême complexité de la réaction inflammatoire. L'hypothèse s'avère toutefois des plus intéressantes.

Une troisième hypothèse discutée par ET Morgan concerne le rôle des métabolites biologiquement actifs de l'acide arachidonique, tels les acides époxy-eicosatriénoïques (EET) qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires et vasodilatatrices. La formation des EET est catalysée par les isoformes des sous-familles CYP2J et 2C; la suppression du P450 dans l'inflammation préviendrait donc l'action de ces métabolites endogènes. Lorsque cet auteur rappelle que la formation des métabolites biologiquement actifs se déroule au niveau de l'endothélium, et que de plus on ignore si les métabolites formés dans le foie pourraient agir sur les hépatocytes, le lien avec la suppression du P450 hépatique dans l'inflammation devient ténu.

Une observation originale de Boucher et coll. offre une perspective nouvelle : le cytochrome P450 de la sous-famille 3A peut catalyser la formation de NO à partir de la N-hydroxy-arginine (Renaud JP et coll., 1993). Il serait donc possible que la baisse du P450 durant l'inflammation contribue à diminuer la production de NO et à prévenir ses effets délétères. La pertinence de ce concept s'est vue renforcée par les travaux de PC Kuo, lesquels ont rapporté que l'inhibition du CYP3A de rat par la cimétidine réduit par

plus de 90% la formation de NO dans des hépatocytes exposés au TNF- α (Kuo PC et coll., 1995). L'inhibition non spécifique du P450 bloque également la formation de NO induite par le LPS (Fantuzzi G et coll., 1993). Cependant, et tel que discuté par ET Morgan, l'hypothèse d'un rôle du P450 en tant que source directe de NO présente des faiblesses. Premièrement, on met en doute la spécificité des inhibiteurs du CYP3A utilisés. Deuxièmement, le CYP3A n'effectue que la deuxième étape de la réaction catalysée par la NOS. La L-arginine n'est pas un substrat de l'isoenzyme. Enfin, pour que la réaction se produise à une vitesse susceptible de générer assez de NO pour causer des dommages tissulaires, il faut des conditions qui augmentent l'activité de la NOS, par exemple lors d'un traitement au LPS qui majore la teneur en N-hydroxy-arginine et s'accompagne d'une augmentation de la NOS2. Les travaux plus récents du groupe de Boucher suggèrent que le cytochrome P450 pourrait utiliser d'autres substrats pour générer le NO (voir le rapport de symposium, dans Morgan ET et coll. 2001). Cette avenue de recherche demeure donc actuelle et potentiellement fertile.

Les projets de recherches effectués dans notre laboratoire depuis plusieurs années ont permis d'élucider certains des effets de l'inflammation sur le système P450, ces données nous servent aujourd'hui à proposer une avenue de recherche quant aux répercussions sur l'organisme. Nous avons démontré que la réduction d'activité du P450 est le premier phénomène survenant lors de l'inflammation, suivi par la répression. Si l'organisme tire un avantage de cette baisse du métabolisme, la diminution d'activité, laquelle permet une baisse très rapide, représente donc un premier bénéfice. Il est probable que la diminution d'activité à elle seule ne puisse pas assurer toute la baisse requise du P450 hépatique, qui nécessiterait en plus le phénomène de répression (la contribution relative de chacun reste à définir).

Pour déterminer les avantages et/ou inconvénients de la baisse du P450 hépatique lors de l'inflammation, nous proposons d'utiliser des souris transgéniques qui expriment de façon constitutive, à un taux élevé et constant, une isoforme du P450 (par exemple le CYP3A4). Ceci permettrait de prédire les effets et conséquences bénéfiques et/ou délétères pour l'animal de la persistance de cette activité du P450 durant l'infection et l'inflammation.

Travaux futurs

Les recherches concernant l'impact d'états physiopathologiques sur le cytochrome P450 s'orientent principalement vers une compréhension approfondie des mécanismes impliqués dans sa régulation, en particulier au niveau moléculaire. Ceci comprend la connaissance des voies de signalisation activées par les cytokines, le rôle spécifique des SOR et des kinases dans la diminution d'activité du P450, le rôle des récepteurs nucléaires et des facteurs de transcription dans la régulation de l'expression génique, ainsi que les modifications post-traductionnelles de protéines. À long terme, ces connaissances permettront de réduire les risques de toxicité et de prévenir les effets indésirables résultant de l'altération du métabolisme des médicaments observés dans plusieurs conditions pathologiques.

Nos travaux portant sur la diminution de l'activité du P450 ont montré que dans le modèle d'inflammation aseptique, seule l'IL-6 est impliquée. Ce résultat nous incite à concentrer les recherches sur les voies de signalisation spécifiquement empruntées par l'IL-6 afin de déterminer les mécanismes d'action responsables. Notre laboratoire a documenté la nature des kinases impliquées dans la diminution de l'activité du P450 : des résultats récents démontrent que la baisse d'activité du P450 total et des CYP1A1, 1A2 et

3A6 est à médiation par des enzymes de la famille des sérine-thréonine kinases (Levithchi, M et coll., manuscrit en préparation). L'étude de la phosphorylation des CYP1A1, 1A2 et 3A6 par marquage radioactif devrait nous renseigner sur le taux et les sites spécifiques de cette modification post-traductionnelle requis pour rendre compte de l'effet de l'IL-6 dans la baisse d'activité du P450. Nous pensons aussi qu'il sera révélateur d'explorer le rôle des phosphatases, dont la modulation peut rapidement et de façon marquée influencer l'état de phosphorylation de substrats. Les travaux de notre équipe ont également révélé l'implication des SOR dans la baisse d'activité du P450; il devient donc pertinent d'identifier ceux formés spécifiquement sous l'effet de l'IL-6 et de déterminer à quel niveau ils interviennent. Des études similaires visant les cytokines actives dans l'infection virale chez l'humain (IL-1 β , IL-6 et IFN- γ) serviront à déterminer les voies de transduction activées dans ce type de réaction inflammatoire.

Nous avons identifié les cytokines impliquées dans la répression de la transcription des gènes des CYP1A1, 1A2 et 3A6 dans les deux modèles d'inflammation. Cet avancement oriente la recherche particulièrement sur les voies de signalisation activées par ces cytokines et potentiellement impliquées dans la régulation négative du P450. À cette fin, on pourra utiliser des approches capables de discriminer leurs rôles respectifs 1) des micro-puces à ADN afin d'identifier les gènes dont l'expression est modifiée par les cytokines, 2) des essais de retard sur gel pour cibler les facteurs de transcription se liant aux régions de contrôle des gènes des isoformes du P450 et susceptibles d'en moduler l'expression, 3) l'inactivation spécifique de protéines tels les kinases et facteurs de transcription, ainsi que des SOR faisant partie des voies de signalisation activées par les cytokines, et 4) l'utilisation de souris knock-out pour les gènes reconnus pour influencer l'expression des isoformes du P450.

Avant d'élaborer, et surtout d'appliquer des stratégies visant à contrer la baisse du P450 hépatique, il est capital de bien connaître tous les avantages et inconvénients que cette baisse apporte à l'organisme. L'incidence accrue d'effets indésirables des médicaments engendrés par l'inflammation représente un incitatif puissant à développer de telles stratégies. Toutefois, si l'organisme tire un avantage de cette baisse du P450, la contrer pourrait créer de nouveaux problèmes de santé chez les patients. Des travaux supplémentaires s'imposent donc afin d'élucider la finalité de la baisse du P450 observée dans plusieurs états physiopathologiques. Nous pensons que la création d'animaux transgéniques exprimant de façon artificiellement contrôlable une isoforme du P450 représente une voie des plus prometteuses.

Conclusion

Depuis sa découverte, l'historique du cytochrome P450 foisonne d'avancées majeures qui ont grandement contribué à l'essor de la pharmacologie et au développement de médicaments plus efficaces et moins toxiques. Les recherches effectuées durant la dernière décennie ont apporté de nouveaux arguments en faveur d'un rôle des enzymes du P450 en tant que participants actifs dans l'homéostasie, plutôt qu'une fonction passive d'enzymes de faible spécificité pour l'élimination générale de composés chimiques.

L'activité métabolique du P450 hépatique est profondément affectée par divers stimuli inflammatoires, avec des conséquences cliniques et toxicologiques. Ici, les cytokines sont les médiateurs responsables de la baisse d'activité et d'expression des isoformes du P450. Les études réalisées dans notre laboratoire ont permis de raffiner certaines notions sur le contrôle du P450 et de mettre en évidence plusieurs faits

nouveaux: 1) le type de réaction inflammatoire détermine la nature des cytokines actives et leurs répercussions sur l'activité et l'expression du P450; 2) l'amplitude de la réponse aux cytokines sériques dépend de la sensibilité des cellules: les hépatocytes provenant de lapins avec réaction inflammatoire répondent plus que ceux de lapins normaux; 3) la régulation négative du P450 est précédée par une diminution de son activité catalytique; 4) les différentes isoformes du P450 répondent selon des mécanismes de régulation qui diffèrent en fonction de la nature des cytokines.

Le concept de sélectivité à différents niveaux du contrôle du P450 est important non seulement pour son impact clinique et toxicologique, mais également parce qu'il sous-tend l'existence de plusieurs mécanismes de régulation. La baisse d'activité d'une enzyme individuelle du P450 est généralement accompagnée d'une réduction de sa quantité ainsi que de la teneur en son ARNm. Une diminution de l'expression des gènes du P450 apparaît donc comme le mécanisme prédominant pour expliquer la baisse de l'activité de biotransformation. Le rôle bénéfique ou délétère de cette réduction de l'ensemble des isoformes du P450 hépatique lors de l'inflammation reste toutefois énigmatique.

Références

- Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, Beaune P, et Guillouzo A. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharm* 44(4): 707-715, 1993.
- Andreani M, Olivier JL, Berenbaum F, Raymondjean M, et Bereziat G. Transcriptional regulation of inflammatory secreted phospholipases A(2). *Biochim Biophys Acta* 1488(1-2): 149-158, 2000.
- Ansher S, Thompson W, Snoy P, et Habig W. Role of endotoxin in alterations of hepatic drug metabolism by diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine adsorbed. *Infect Immun* 60(9): 3790-3798, 1992.
- Arrhenius E. Effects on hepatic microsomal N- and C-oxygenation of aromatic amines by in vivo corticosteroid or aminofluorene treatment, diet, or stress. *Cancer Res* 28(2): 264-273, 1968.
- Ashton FE, Jamieson JC, et Friesen AD. Studies on the effect of inflammation on rat serum proteins. *Can J Biochem* 48(8): 841-850, 1970.
- Auron PE. The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev* 9(3-4): 221-237, 1998.
- Axelrod J. The enzymatic demethylation of ephedrine. *J Pharmacol* 114: 430-438, 1955.
- Baer AN, McAllister CB, Wilkinson GR, Woosley RL, et Pincus T. Altered distribution of debrisoquine oxidation phenotypes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 29(7): 843-850, 1986.
- Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, et McKean DJ. Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci* 59(2): 61-83, 1996.
- Barakat M et 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* 48(9): 906-910, 1996.

- Barakat MM, El-Kadi AO, et 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* 69(13): 1559-1571, 2001.
- Barclay TB, Peters JM, Sewer MB, Ferrari L, Gonzalez FJ, et Morgan ET. Modulation of cytochrome P-450 gene expression in endotoxemic mice is tissue specific and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha dependent. *J Pharmacol Experim Therap* 290(3): 1250-1257, 1999.
- Barker CW, Fagan JB, et Pasco DS. Interleukin-1 beta suppresses the induction of P4501A1 and P4501A2 mRNAs in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 267(12): 8050-8055, 1992.
- Barnes PJ. Current therapies for asthma. Promise and limitations. *Chest* 111(2): 17S-26S, 1997.
- Bartlomowicz B, Waxman DJ, Utesch D, Oesch F, et Friedberg T. Phosphorylation of carcinogen metabolizing enzymes: regulation of the phosphorylation status of the major phenobarbital inducible cytochromes P-450 in hepatocytes. *Carcinogenesis* 10(1) : 225-228, 1989.
- Batra JK, Venkitasubramanian TA, et Raj HG. Drug metabolism in experimental tuberculosis: I. Changes in hepatic and pulmonary monooxygenase activities due to infection. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 12(1): 109-114, 1987.
- Baud V et Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11(9): 372-377, 2001.
- Baumann H et Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 15(2): 74-80, 1994.
- Beck FJ et Whitehouse MW. Effect of adjuvant disease in rats on cyclophosphamide and isophosphamide metabolism. *Biochem Pharmacol* 22(19): 2453-2468, 1973.
- Benet LZ, Kroetz DL, et Sheiner LB. *The Pharmacological Basis Of Therapeutics*, (Chapitre 1: Pharmacokinetics, pages 3-28). 9^{ème} édition,. New-York, McGraw-Hill Companies, Molinoff PB and Ruddon RW, 1995.

- Benjamini E et Leskowitz S. *Immunology: A Short Course*. 2^{ème} édition. New-York, Wiley-Liss, Inc. 1991.
- Bernhardt R. Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127: 137-221, 1996.
- Bleau AM, Fradette C, El-Kadi AOS, Cote MC, et 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* 29(7): 1007-1012, 2001.
- Bleau AM, Levitchi MC, Maurice H, et 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* 130(8): 1777-1784, 2000.
- Bredt DS et Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63: 175-195, 1994.
- du Bois RN et Waterman MR. Effect of phenobarbital administration to rats on the level of the in vitro synthesis of cytochrome P450 directed by total rat liver RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 90: 150-157, 1979.
- Brodie BB, Axelrod J, Cooper JR, Gaudette L, LaDu BN, Mitoma C, et Udenfriend S. Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science* 121: 603-604, 1955.
- Brockmeyer NH, Barthel B, Mertins L, et Goos M. Changes of antipyrine pharmacokinetics during influenza and after administration of interferon-alpha and -beta. *Int J Clin Pharmacol Ther* 36(6): 309-311, 1998.
- Bunn HF et Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 76(3): 839-885, 1996.
- Calleja C, Eeckhoutte C, Dacasto M, Larrieu G, Dupuy J, Pineau T, et Galtier P. Comparative effects of cytokines on constitutive and inducible expression of the gene encoding for the cytochrome P450 3A6 isoenzyme in cultured rabbit

- hepatocytes: consequences on progesterone 6beta-hydroxylation. *Biochem Pharmacol* 56(10): 1279-1285, 1998.
- Calleja C, Eeckhoutte C, Larrieu G, Dupuy J, Pineau T, et Galtier P. Differential effects of interleukin-1 beta, interleukin-2, and interferon-gamma on the inducible expression of CYP 1A1 and CYP 1A2 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 239(1): 273-278, 1997.
- Carballo M, Conde M, El Bekay R, Martin-Nieto J, Camacho MJ, Monteseirin J, Conde J, Bedoya FJ, et Sobrino F. Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J Biol Chem* 274(25): 17580-17586, 1999.
- Carlson TJ et Billings RE. Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450. *Mol Pharm* 49(5): 796-801, 1996.
- Chalfant CE, Kishikawa K, Mumby MC, Kamibayashi C, Bielawska A, et Hannun YA. Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2a. activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 274(29): 20313-20317, 1999.
- Chang KC, Lauer B.A., et Bell T.D. Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness. *Lancet* 1: 1132-1133, 1978.
- Chang TKH et Waxman DJ. *Cytochrome P450: Metabolic And Toxicological Aspects*, (Chapitre : The CYP2A Subfamily, pages 99-134). Costas Ioannides. 1996, CRC Press, Guilford.
- Chen JQ, Strom A, Gustafsson JA, et Morgan ET. Suppression of the constitutive expression of cytochrome P-450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: comparison with induction of acute-phase genes and demonstration that CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. *Mol Pharm* 47(5): 940-947, 1995.
- Chen YL, Florentin I, Batt AM, Ferrari L, Giroud JP, et Chauvelot-Moachon L. Effects of interleukin-6 on cytochrome P450-dependent mixed-function oxidases in the rat. *Biochem Pharmacol* 44(1): 137-148, 1992.

- Chung I et Bresnick E. Identification of positive and negative regulatory elements of the human cytochrome P4501A2 (CYP1A2) gene. *Arch Biochem Biophys* 338(2): 220-226, 1997.
- Clark MA, Bing BA, Gottschall PE, et Williams JF. Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-methylcholanthrene induction of P450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 49(1): 97-104, 1995.
- Clerk A, Michael A, et Sugden PH. Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem J* 333(Pt 3): 581-589, 1998.
- Cooper AL, Brouwer S, Turnbull AV, Luheshi GN, Hopkins SJ, Kunkel SL, et Rothwell NJ. Tumor necrosis factor-alpha and fever after peripheral inflammation in the rat. *Am J Physiol* 267(6 Pt 2): R1431-R1436, 1994.
- Correia MA. Cytochrome P450 turnover. *Methods Enzymol* 206: 315-325, 1991.
- Cotran RS, Kumar V, et Collins T. *Robbins Pathologic Basis Of Disease* (Chapitre 3 : Acute and chronic inflammation, pages 50-88). W.B. Saunders Company, 6^{ème} édition, 1999, Philadelphie.
- Craig PI, Tapner M, et Farrell GC. Interferon suppresses erythromycin metabolism in rats and human subjects. *Hepatology* 17(2): 230-235, 1993.
- Cribb AE, Delaporte E, Kim SG, Novak RF, et Renton KW. Regulation of cytochrome P-4501A and cytochrome P-4502E induction in the rat during the production of interferon alpha/beta. *J Pharmacol Exper Therap* 268(1): 487-494, 1994.
- Dai Y, Rashba-Step J, et Cederbaum AI. Stable expression of human cytochrome P4502E1 in HepG2 cells: characterization of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates. *Biochemistry* 32(27): 6928-6937, 1993.
- Dawson AH et Whyte IM. Therapeutic drug monitoring in drug overdose. *Br J Clin Pharmacol* 52 (Suppl 1): 97S-102S, 2001.

- Daujat M, Clair P, Astier C, Fabre I, Pineau T, Yerle M, Gellin J, et Maurel P. Induction, regulation and messenger half-life of cytochromes P450 IA1, IA2 and IIIA6 in primary cultures of rabbit hepatocytes. CYP 1A1, 1A2 and 3A6 chromosome location in the rabbit and evidence that post-transcriptional control of gene IA2 does not involve mRNA stabilization. *Eur J Biochem* 200(2): 501-510, 1991.
- Daujat M, Pichard L, Dalet C, Larroque C, Bonfils C, Pompon D, Li D, Guzelian PS, et Maurel P. Expression of five forms of microsomal cytochrome P-450 in primary cultures of rabbit hepatocytes treated with various classes of inducers. *Biochem Pharmacol* 36(21): 3597-3606, 1987.
- Decker K. The response of liver macrophages to inflammatory stimulation. *Keio J Med* 47(1): 1-9, 1998.
- Delaporte E, Cribb AE, et Renton KW. Modulation of rat hepatic CYP3A1 induction by the interferon inducer polyinosinic acid-polycytidylic acid (polyic). *Drug Metab Dispos* 21(3): 520-523, 1993.
- Delaporte E et Renton KW. Cytochrome P4501A1 and cytochrome P4501A2 are downregulated at both transcriptional and post-transcriptional levels by conditions resulting in interferon-alpha/beta induction. *Life Sci* 60(10): 787-796, 1997.
- Delescluse C, Lemaire G, de Sousa G, et Rahmani R. Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology* 153(1-3): 73-82, 2000.
- Dinarelli CA. Blocking interleukin-1 receptors. *Int J Clin Lab Res* 24(2) : 61-79, 1994.
- Doanes AM, Hegland DD, Sethi R, Bruder JT, et Finkel T. VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 255(2): 545-548, 1999.
- Dogra SC, Whitelaw ML, et May BK. Transcriptional activation of cytochrome P450 genes by different classes of chemical inducers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25(1) : 1-9, 1998.

- Dolin R. *Harrison's Principle of Internal Medicine* (Chapitre: Common viral respiratory infections, pages 803-807). K.J. Isselbacher, E. Braunwald J. D. Wilson J. B. Martin A. S. Fauci D. L. Kasper eds. 13^{ème} édition, 1994, Toronto, McGraw-Hill.
- Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Jover R, Nakamura T, et Castell JV. Human hepatocyte growth factor down-regulates the expression of cytochrome p450 isozymes in human hepatocytes in primary culture. *J Pharmacol Exp Ther* 284(2): 760-767, 1998.
- du Souich P, Hoen B, Saunier C, Hartemann D, Sautegeau A, Cornette A, Delorme N, Polu JM, et Sadoul P. Theophylline disposition in patients with COLD with and without hypoxemia. *Chest* 95(5): 1028-1032, 1989.
- El-Kadi AOS, Maurice H, Ong H, et 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* 121(6): 1164-1170, 1997.
- El-Kadi AOS, Bleau AM, Dumont I, Maurice H, et 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* 28(9): 1112-1120, 2000.
- Eliasson E, Mkrтчian S, Halpert JR, et Ingelman-Sundberg M. Substrate-regulated, cAMP-dependent phosphorylation, denaturation, and degradation of glucocorticoid-inducible rat liver cytochrome P450 3A1. *J Biol Chem* 269(28): 18378-18383, 1994.
- Endo Y, Tsuruya S, et Fujihira E. Hepatic drug-metabolizing enzyme activities and anti-inflammatory potency of hydrocortisone in rats with granulomatous inflammation. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 33(2): 195-206, 1981.
- Engler R. Proteins of the inflammatory reaction. Regulatory functions. *Ann Biol Clin* 46(5): 336-342, 1988.
- Erickson RW, Langel-Peveri P, Traynor-Kaplan AE, Heyworth PG, et Curnutte JT. Activation of human neutrophil NADPH oxidase by phosphatidic acid or

diacylglycerol in a cell-free system. activity of diacylglycerol is dependent on its conversion to phosphatidic acid. *J Biol Chem* 274(32): 22243-22250, 1999.

Estabrook RW, Vermeulen NPE, et Guengerich FP. *Cytochrome P450: metabolic and toxicological aspects* (Chapitre: Cytochrome P450: from a single protein to a family of protein, pages 4-23). Costas Ioannides, 1996, Guilford, CRC Press.

Evans P et Halliwell B. Free radicals and hearing - Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci* 884: 19-40, 1999.

de Fabiani E, Mitro N, Anzulovich AC, Pinelli A, Galli G, et Crestani M. The negative effects of bile acids and tumor necrosis factor-alpha on the transcription of cholesterol 7alpha -hydroxylase gene (CYP7A1) converge to Hepatic Nuclear Factor-4. A novel mechanism of feedback regulation of bile acid synthesis mediated by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276(33): 30708-30716, 2001.

Fantuzzi G et Dinarello CA. The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *J Leukoc Biol* 59(4): 489-493, 1996.

Fattori E, Cappelletti M, Costa P, Sellitto C, Cantoni L, Carelli M, Faggioni R, Fantuzzi G, Ghezzi P, et Poli V. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J Exp Med* 180(4): 1243-1250, 1994.

Ferrari L, Jouzeau JY, Gillet P, Herber R, Fener P, Batt AM, et Netter P. Interleukin-1 beta differentially represses drug-metabolizing enzymes in arthritic female rats. *J Pharmacol Exp Ther* 264(2): 1012-1020, 1993.

Finkel T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 476(1-2): 52-54, 2000.

Flescher E, Tripoli H, Salnikow K, et Burns FJ. Oxidative stress suppresses transcription factor activities in stimulated lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 112(2): 242-247, 1998.

Freeswick PD, Wan Y, Geller DA, Nussler AK, et Billiar TR. Remote tissue injury primes hepatocytes for nitric oxide synthesis. *J Surg Res* 57(1): 205-209, 1994.

- Fuchs J, Zollner TM, Kaufmann R, et Podda M. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radic Biol Med* 30(4): 337-353, 2001.
- Fujii-Kuriyama Y, Mizukami Y, Kawajiri K, Sogawa K, Muramatsu M. Primary structure of a cytochrome P450: coding sequence of phenobarbital-inducible cytochrome P450 cDNA from rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2793-2797, 1982.
- Galal A et Souich P. 21-aminosteroids prevent the down-regulation of hepatic cytochrome P450 induced by hypoxia and inflammation in conscious rabbits. *Br J Pharmacol* 128(2): 374-379, 1999.
- Galea E et Feinstein DL. Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *FASEB J* 13(15): 2125-2137, 1999.
- Galtier P, Kaddouri M, et Eeckhoutte C. Compared N-demethylation of veterinary drugs by microsomes from normal and fluke-infected sheep livers. *J Vet Pharmacol Ther* 16(1): 106-109, 1993.
- Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymatic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* 77: 493-509, 1958.
- Gascon-Barré M, Demers C, Ghrab O, Theodoropoulos C, Lapointe R, Jones G, Valiquette L, et Menard D. Expression of CYP27A, a gene encoding a vitamin D-25 hydroxylase in human liver and kidney. *Clin Endocrinol* 54(1): 107-115, 2001.
- Gerhold DD, Lu MG, Xu JN, Austin CR, Caskey CT, et Rushmore TS. Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using DNA microarrays. *Physiol Genom* 5(4): 161-170, 2001.
- Ghezzi P, Saccardo B, Villa P, Rossi V, Bianchi M, et Dinarello CA. Role of interleukin-1 in the depression of liver drug metabolism by endotoxin. *Infect Immun* 54(3): 837-840, 1986.
- Goldkorn T, Balaban N, Matsukuma K, Chea V, Gould R, Last J, Chan C, et Chavez C. EGF-receptor phosphorylation and signaling are targeted by H₂O₂ redox stress. *Am J Resp Cell Mol Biol* 19(5): 786-798, 1998.

- Grant MH, Rodgers EH, Anderson K, Haydon GH, et Hayes PC. The effect of serum from liver cancer patients on the growth and function of primary and immortalised hepatocytes. *Int J Artif Organs* 24(11) : 807-813, 2001.
- Guha M et Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13(2): 85-94, 2001.
- Guengerich FP. *Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry* (Chapitre: Human cytochrome P450 enzymes, pages 473-507). Ortiz de Montellano PR. . 2ème édition, 1995, New-York, Plenum Press.
- Guengerich FP. *Cytochrome P450 : metabolic and Toxicological aspects* (Chapitre 3 : The chemistry of cytochrome P450, pages 55-76). Costas Ioannides, 1996, New-York, CRC Press.
- Guerre P, Pineau T, Costet P, Burgat V, et Galtier P. Effects of AFB1 on CYP 1A1, 1A2 and 3A6 mRNA, and P450 expression in primary culture of rabbit hepatocytes. *Toxicol Lett* 111(3): 243-251, 2000.
- Ha HR, Chen J, Freiburghaus AU, Follath F. Metabolism of theophylline by cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Br J Clin Pharmacol* 39(3): 321-326, 1995.
- Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, et Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 33(7): 601-617, 1995.
- Haniu M, Armes LG, Yasunobu KT, Shastry BA, Gunsalus IC. Amino acid sequence of the *Pseudomonas Putida* cytochrome P450. *J Biol Chem* 257: 12667-12671, 1982.
- Hashimoto Y, Yamano T, et Mason HS. An electron spin resonance study of microsomal electron transport. *J Biol Chem* 237: 3843-3844, 1962.
- Hendeles L et Weinberger M. Theophylline. A "state of the art". *Pharmacotherapy* 3(1): 2-44, 1983.

- Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16(3-4): 249-284, 1998.
- Hodgson PD et Renton KW. The role of nitric oxide generation in interferon-evoked cytochrome P450 down-regulation. *Int J Immunopharmacol* 17(12): 995-1000, 1995.
- Honkakoski P et Negishi M. Protein serine/threonine phosphatase inhibitors suppress phenobarbital-induced Cyp2b10 gene transcription in mouse primary hepatocytes. *Biochem J* 330(Pt 2): 889-895, 1998.
- Honkakoski P et Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* 347(Pt 2): 321-337, 2000.
- Iber H, Chen Q, Cheng PY, et Morgan ET. Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukin-1 mediated by NF-kappaB binding at the transcription start site. *Arch Biochem Biophys* 377(1): 187-194, 2000.
- Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ, et Castell JV. Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett* 431(2): 227-230, 1998.
- Jun CD, Oh CD, Kwak HJ, Pae HO, Yoo JC, Choi BM, Chun JS, Park RK, et Chung HT. Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW 264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis: involvement of c-Jun N-Terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase, p38 Kinase, and CPP-32 protease pathways. *J Immunol* 162(6): 3395-3401, 1999.
- Kambe T, Tada-Kambe J, Kuge Y, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, et Sasaki R. Retinoic acid stimulates erythropoietin gene transcription in embryonal carcinoma cells through the direct repeat of a steroid/thyroid hormone receptor response element half-site in the hypoxia-response enhancer. *Blood* 96(9): 3265-3271, 2000.
- Kapitulnik J et Strobel HW. Extrahepatic drug metabolizing enzymes. *J Biochem Mol Toxicol* 13(5): 227-230, 1999.

- Karuzina II et Archakov AI. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P450 during monooxygenase reactions. *Free Radic Biol Med* 17(6): 557-567, 1994.
- Katagiri M, Ganguli BN, et Gunsalus IC. A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. *J Biol Chem* 243(12): 3543-3546, 1968.
- Kato R, Nakamura Y, et Chiesara E. Enhanced phenobarbital induction of liver microsomal drug metabolizing enzymes in mice infected with murine hepatitis virus. *Biochem Pharmacol* 12: 363-370, 1963.
- Kawajiri K et Hayashi SI. *Cytochrome P450: Metabolic And Toxicological Aspects* (Chapitre : The CYP1 family, pages 77-98). Costas Ioannides, 1996, Guildford, CRC Press.
- Khatsenko O et Kikkawa Y. Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 280(3): 1463-1470, 1997.
- Kikuchi H, Hossain A, Yoshida H, et Kobayashi S. Induction of cytochrome P-450 1A1 by omeprazole in human HepG2 cells is protein tyrosine kinase-dependent and is not inhibited by alpha-naphthoflavone. *Arch Biochem Biophys* 358(2): 351-358, 1998.
- Kim H et 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* 19(8): 5326-5338, 1999.
- Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75: 376-386, 1958.
- Knickle LC, Spencer DF, et Renton KW. The suppression of hepatic cytochrome P4504A mRNA mediated by the interferon inducer polyinosinic acid.polycytidylic acid. *Biochem Pharmacol* 44(3): 604-608, 1992.
- Kobusch AB, Erill S, et du Souich P. Relationship between changes in seromucoid concentrations and the rate of oxidation or acetylation of several substrates. *Drug Metab Dispos* 14(6): 663-667, 1986.

- Kokwaro GO, Glazier AP, Ward SA, Breckenridge AM, et Edwards G. Effect of malaria infection and endotoxin-induced fever on phenacetin O-deethylation by rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 45(6): 1235-1241, 1993.
- Konstantinos AP et Sheridan JF. Stress and influenza viral infection: modulation of proinflammatory cytokine responses in the lung. *Respir Physiol* 128(1) : 71-77, 2001.
- Korsmeyer KK, Davoll S, Figueiredo-Pereira ME, et Correia MA. Proteolytic degradation of heme-modified hepatic cytochromes P450: A role for phosphorylation, ubiquitination, and the 26S proteasome. *Arch Biochem Biophys* 365(1): 31-44, 1999.
- Kozak W, Poli V, Soszynski D, Conn CA, Leon LR, et Kluger MJ. Sickness behavior in mice deficient in interleukin-6 during turpentine abscess and influenza pneumonitis. *Am J Physiol* 272(2 Pt 2): R621-R630, 1997.
- Kraemer MJ, Furukawa CT, Koup JR, Shapiro GG, Pierson WE, et Bierman CW. Altered theophylline clearance during an influenza B outbreak. *Pediatrics* 69(4): 476-480, 1982.
- Kurdi J, Maurice H, El-Kadi AOS, Ong H, Dalkara S, Belanger PM, et du Souich P. Effect of hypoxia alone or combined with inflammation and 3-methylcholanthrene on hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits. *Br J Pharmacol* 128(2): 365-373, 1999.
- Kurokohchi K, Yoneyama H, Matsuo Y, Nishioka M, et Ichikawa Y. Effects of interleukin 1 alpha on the activities and gene expressions of the cytochrome P450IID subfamily. *Biochem Pharmacol* 44(8) : 1669-1674, 1992.
- Lake BG et Lewis DFV. *Cytochrome P450 : metabolic and toxicological aspects* (Chapitre : The CYP4 Family, pages 271-300). Costas Ioannides, 1996, Guilford, CRC Press.
- Laroux FS, Lefer DJ, Kawachi S, Scalia R, Cockrell AS, Gray L, Van der Heyde H, Hoffman JM, et Grisham MB. Role of nitric oxide in the regulation of acute and chronic inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2(3) : 391-396, 2000.

- Leblond F, Guevin C, Demers C, Pellerin I, Gascon-Barre M, et Pichette V. Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 12(2) : 326-332, 2001.
- Lechat P, Heusghem C, et Lagier G. *Pharmacologie Cliniques - Base de la thérapeutique* (Chapitre : Incidents et accidents d'origine médicamenteuse, pages 104-122). Giroux JP, Mathé G, and Mayniel G, 1988, Paris, Expansion Scientifique Francaise.
- Levy M. Role of viral infections in the induction of adverse drug reactions. *Drug Saf* 16(1): 1-8, 1997.
- Lewis DF et Hlavica P. Interactions between redox partners in various cytochrome P450 systems: functional and structural aspects. *Biochim Biophys Acta* 1460(2-3): 353-374, 2000.
- Li-Masters T et Morgan ET. Effects of bacterial lipopolysaccharide on phenobarbital-induced CYP2B expression in mice. *Drug Metab Dispos* 29(3): 252-257, 2001.
- Li SY et Dougherty JJ. Inhibitors of serine/threonine-specific protein phosphatases stimulate transcription by the Ah receptor/Arnt dimer by affecting a step subsequent to XRE binding. *Arch Biochem Biophys* 340(1): 73-82, 1997.
- Li W, Xia J, et Sun GY. Cytokine induction of iNOS and sPLA2 in immortalized astrocytes (DITNC): response to genistein and pyrrolidine dithiocarbamate. *J Interferon Cytokine Res* 19(2): 121-127, 1999.
- Liu S, Khemlani LS, Shapiro RA, Johnson ML, Liu K, Geller DA, Watkins SC, Goyert SM, et Billiar TR. Expression of CD14 by hepatocytes: upregulation by cytokines during endotoxemia. *Infect Immun* 66(11): 5089-5098, 1998.
- Lowenstein SR et Schier RW. *Clinical Internal Medicine in the aged* (Chapitre 1 : Social and political aspect of aging, pages 1-23). Schier R.W, 1982, Philadelphia, Saunders Company.
- Lowry SF. Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 128(11) : 1235-1245, 1993.

- Lu AY et Coon MJ. Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J Biol Chem* 243(6): 1331-1332, 1968.
- Luheshi GN, Stefferl A, Turnbull AV, Dascombe MJ, Brouwer S, Hopkins SJ, et Rothwell NJ. Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF-alpha in the rat. *Am J Physiol* 272(3 Pt 2): R862-R868, 1997.
- Madoff LC et Kasper DL. *Harrison's Principle of Internal Medicine* (Chapitre : Introduction to infectious disease: host-parasite interaction, pages 485-489). Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL eds. 13^{ème} édition, 1994, Toronto, McGraw-Hill, Inc.
- Matuschak GM, Johanns CA, Chen Z, Gaynor J, et Lechner AJ. Brief hypoxic stress down-regulates E. coli-induced IL-1 and IL-1 β gene expression in perfused liver. *Am J Physiol* 271: R1311-R1318, 1996.
- Maurel P. *Cytochrome P450 : metabolic and toxicological aspects* (Chapitre: The CYP3A Family, pages 241-270). Costas Ioannides, 1996, Guilford, CRC Press.
- McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108(8): 652-659, 2000.
- Medvedev AE, Blanco JC, Qureshi N, et Vogel SN. Limited role of ceramide in lipopolysaccharide-mediated mitogen-activated protein kinase activation, transcription factor induction, and cytokine release. *J Biol Chem* 274(14): 9342-9350, 1999.
- Meehan RT. Immune suppression at high altitude. *Ann Emerg Med* 16: 974-979, 1987.
- Miller EC, Miller JA et Brown RR. On the inhibitory action of certain polycyclic hydrocarbons on azo dye carcinogenesis. *Cancer Res* 12: 282-283, 1952.
- Milosevic N, Schawalder H, et Maier P. Kupffer cell-mediated differential down-regulation of cytochrome P450 metabolism in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 368(1) : 75-87, 1999.

- Mitchell SR, Sewer MB, Kardar SS, et Morgan ET. Characterization of CYP4A induction in rat liver by inflammatory stimuli: dependence on sex, strain, and inflammation-evoked hypophagia. *Drug Metab Dispos* 29(1): 12-22, 2001.
- Monshouwer M, Witkamp RF, Nijmeijer SM, Van Leengoed LA, Verheijden JH, et Van Miert AS. Infection (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)-mediated suppression of oxidative hepatic drug metabolism and cytochrome P4503A mRNA levels in pigs. *Drug Metab Dispos* 23(1): 44-47, 1995.
- Moochhala SM, Renton KW, et Stebbing N. Induction and depression of cytochrome P-450-dependent mixed-function oxidase by a cloned consensus alpha-interferon (IFN-alpha CON1) in the hamster. *Biochem Pharmacol* 38(3): 439-447, 1989.
- Morel Y et Barouki R. Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1. *J Biol Chem* 273(41): 26969-26976, 1998.
- Morley SD, Viard I, Parker KL, et Mullins JJ. Adrenocortical-specific transgene expression directed by steroid hydroxylase gene promoters. *Endocr Res* 22(4): 631-639, 1996.
- Morgan ET. Suppression of constitutive cytochrome P-450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxin. *Mol Pharmacol* 36(9): 699-707, 1989.
- Morgan ET. Down-regulation of multiple cytochrome P450 gene products by inflammatory mediators in vivo. Independence from the hypothalamo-pituitary axis. *Biochem Pharmacol* 45(2): 415-419, 1993.
- Morgan ET. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* 29(4): 1129-1188, 1997.
- Morgan ET. Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos* 29(3): 207-212, 2001.

- Morgan ET, Sewer MB, Iber H, Gonzalez FJ, Lee YH, Tukey RH, Okino S, Vu T, Chen YH, Sidhu JS, et Omiecinski CJ. Physiological and pathophysiological regulation of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* 26(12): 1232-1240, 1998.
- Morgan ET, Ullrich V, Daiber A, Schmidt P, Takaya N, Shoun H, McGiff JC, Oyekan A, Hanke CJ, Campbell WB, Park CS, Kang JS, Yi HG, Cha YN, Mansuy D, et Boucher JL. Cytochromes P450 and flavin monooxygenases--targets and sources of nitric oxide. *Drug Metab Dispos* 29(11): 1366-1376, 2001.
- Moritz KU, Walter R, Leopold K, Hadasova E, Engel G, et Siegmund W. Interferon- and streptolysin O-induced activation of protein kinases and inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases in rats. *Pharmazie* 53(4): 268-271, 1998.
- Mugford CA et Kedderis GL. Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev* 30(3): 441-498, 1998.
- Muntané-Relat J, Ourlin JC, Domergue J, et Maurel P. Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 22(4 Pt 1): 1143-1153, 1995.
- Neuzil KM. Influenza: new insights into an old disease. *Curr Infect Dis Rep* 2(3): 224-230, 2000.
- Neuzil KM et Graham BS. Cytokine release and innate immunity in respiratory viral infection. *Virology* 7 : 255-264, 2001.
- Nikolova-Karakashian M, Morgan ET, Alexander C, Liotta DC, et Merrill Jr. Bimodal Regulation of ceramidase by interleukin-1beta . Implications for the regulation of cytochrome P450 2C11 (CYP2C11). *J Biol Chem* 272(30): 18718-18724, 1997.
- Oesch-Bartlomowicz B, Arens HJ, Hengstler JG, et Oesch F. Control of the mutagenicity of aromatic amines by protein kinases and phosphatases. I. The protein phosphatase inhibitors okadaic acid and ortho-vanadate drastically reduce the mutagenicity of aromatic amines. *Arch Toxicol* 71(10): 601-611, 1997.

- Oesch-Bartlomowicz B et Oesch F. Phosphorylation of cytochrome P450 isoenzymes in intact hepatocytes and its importance for their function in metabolic processes. *Arch Toxicol* 64(4): 257-261, 1990.
- Oesch-Bartlomowicz B, Padma PR, Becker R, Richter B, Hengstler JG, Freeman JE, Wolf CR, et Oesch F. Differential modulation of CYP2E1 activity by cAMP-dependent protein kinase upon Ser129 replacement. *Exp Cell Res* 242(1): 294-302, 1998.
- Ohnishi A. A review of clinical use of theophylline in acute asthma: factors influencing kinetic disposition and drug interactions. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 22(4): 253-258, 2000.
- Okuno H, Takasu M, Kano H, Seki T, Shiozaki Y, et Inoue K. Depression of drug-metabolizing activity in the human liver by interferon-beta. *Hepatology* 17(1): 65-69, 1993.
- Omura T et Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239: 2370-2378, 1964.
- Otten U, Marz P, Heese K, Hock C, Kunz D, et Rose-John S. Cytokines and neurotrophins interact in normal and diseased states. *Ann N Y Acad Sci* 917: 322-330, 2000.
- Ouyang Q, Cicek G, Westendorp RG, Cools HJ, van der Klis RJ, et Remarque EJ. Reduced IFN-gamma production in elderly people following in vitro stimulation with influenza vaccine and endotoxin. *Mech Ageing Dev* 121(1-3): 131-137, 2000.
- Paine AJ. The cytochrome P450 gene superfamily. *Int J Exp Pathol* 72(3): 349-63, 1991.
- Paludan SR. Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects. *J Leukoc Biol* 67(1): 18-25, 2000.
- Panesar N, Tolman K, et Mazuski JE. Endotoxin stimulates hepatocyte interleukin-6 production. *J Surg Res* 85(2): 251-258, 1999.

- Parent C, Belanger PM, Jutras L, et du Souich P. Effect of inflammation on the rabbit hepatic cytochrome P-450 isoenzymes: alterations in the kinetics and dynamics of tolbutamide. *J Pharmacol Exper Therap* 261(2): 780-787, 1992.
- Park J., Shigenaga MK, et Ames BN. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(6): 2322-2327, 1996.
- Parmentier JH, Schohn H, Bronner M, Ferrari L, Batt AM, Dauca M, et Kremers P. Regulation of CYP4A1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression by interleukin-1beta, interleukin-6, and dexamethasone in cultured fetal rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 54(8): 889-898, 1997.
- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre JM, Maurel P, et Vilarem MJ. 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, 2000.
- Peterson TC et Renton KW. Depression of cytochrome P-450-dependent drug biotransformation in hepatocytes after the activation of the reticuloendothelial system by dextran sulfate *J Pharmacol Exper Therap* 229(1): 299-304, 1984.
- Peterson TC et Renton KW. Kupffer cell factor mediated depression of hepatic parenchymal cell cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol* 35(9): 1491-1497, 1986.
- Platanias LC et Fish EN. Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol* 27(11): 1583-1592, 1999.
- Ponzoni M et Cornaglia-Ferraris P. Interferon-gamma-stimulated and GTP-binding-proteins-mediated phospholipase A2 activation in human neuroblasts. *Biochem J* 294(Pt 3): 893-898, 1993.
- Proulx M et du Souich P. Acute moderate hypoxia in conscious rabbits: effect on hepatic cytochrome P450 and on reactive oxygen species. *J Pharm Pharmacol* 47(5): 392-397, 1995a.

- Proulx M et 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 Pathol Pharmacol* 87(2) : 221-236, 1995b.
- Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, et Laurent G. Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272(34): 21388-21395, 1997.
- Renaud JP, Boucher JL, Vadon S, Delaforge M, et Mansuy D. Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of N omega-hydroxyarginine to citrulline and nitrogen oxides and occurrence in no synthases of a sequence very similar to the heme-binding sequence in P450s. *Biochem Biophys Res Commun* 192(1): 53-60, 1993.
- Renton KW et Mannering GJ. Depression of hepatic cytochrome P-450-dependent monooxygenase systems with administered interferon inducing agents. *Biochem Biophys Res Commun* 73(2) : 343-348, 1976.
- Renton KW et Nicholson TE. Hepatic and central nervous system cytochrome P450 are down-regulated during Lipopolysaccharide-evoked localized inflammation in brain. *J Pharmacol Exper Therap* 294(2): 524-530, 2000.
- Riddick DS. *Principles of Medical Pharmacology* (Chapitre : Drugs Biotransformation, pages 38-54). Kallant H and Roschlau W, 6ème édition, 1998, Oxford, Oxford University Press.
- Rizzardini M, Carelli M, Cabello Porras MR, et Cantoni L. Mechanisms of endotoxin-induced haem oxygenase mRNA accumulation in mouse liver: synergism by glutathione depletion and protection by N-acetylcysteine. *Biochem J* 304 (Pt 2): 477-483, 1994.
- Roberts ES, Lin H, Crowley JR, Vuletich JL, Osawa Y et Hollenberg PF. Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine and inactivation of the catalytic activity of cytochrome P450 2B1. *Chem Res Toxicol* 11(9): 1067-1074, 1998.

- Roberts ML et Cowsert LM. Interleukin-1 beta and reactive oxygen species mediate activation of c-Jun NH2-terminal kinases, in human epithelial cells, by two independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 251(1): 166-172, 1998.
- Robinson KA, Stewart CA, Pye Q, Floyd RA et Hensley K. Basal protein phosphorylation is decreased and phosphatase activity increased by an antioxidant and a free radical trap in primary rat glia. *Arch Biochem Biophys* 365(2): 211-215, 1999.
- Ronis MJJ, Lindros KO et Ingelman-Sundberg M. *Cytochrome P450 : metabolic and toxicological aspects* (Chapitre 9 : The CYP2E Subfamily, pages 211-241). Costas Ioannides, 1996, Guilford, CRC Press.
- Sakai H, Okamoto T, et Kikkawa Y. Suppression of hepatic drug metabolism by the interferon inducer, polyriboinosinic acid:polyribocitidylic acid. *J Pharmacol Exper Therap* 263(1): 381-386, 1992.
- Sales ME, Sterin-Borda L, de Bracco MM, et Borda ES. Tyrosine kinase regulatory action on ileal muscarinic effects of IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res* 19(4) : 375-382, 1999.
- Samaras SC et Dietz N Jr. Physiopathology of detoxification of phenobarbital (Nembutal) sodium. *Fed Proc* 12: 122-123, 1953.
- Santana P, Llanes L, Hernandez I, Gallardo G, Quintana J, Gonzalez J, Estevez F, Ruiz de Galarreta C, et Fanjul LF. Ceramide mediates tumor necrosis factor effects on P450-aromatase activity in cultured granulosa cells. *Endocrinology* 136(5): 2345-2348, 1995.
- Sarkar MA et Jackson BJ. Theophylline N-demethylations as probes for P4501A1 and P4501A2. *Drug Metab Dispos* 22(6): 827-834, 1994.
- Schieke SM, Briviba K, Klotz LO, et Sies H. Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett* 448(2-3): 301-303, 1999.

- Seifter S et England S. *The liver: Biology and Pathology* (Chapitre 20 : Energy metabolism, pages 323-358). Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA et Shafri DA, 3ème, 1994, New-York, Raven Press.
- Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Ann Rev Cell Dev Biol* 15(1): 551-578, 1999.
- Sengupta TK, Schmitt EM, et Ivashkiv LB. Inhibition of cytokines and JAK-STAT activation by distinct signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9499-9504, 1996.
- Sewer MB, Koop DR, et Morgan ET. Differential inductive and suppressive effects of endotoxin and particulate irritants on hepatic and renal cytochrome P-450 expression. *J Pharmacol Exper Therap* 280(3): 1445-1454, 1997.
- Sewer MB et Morgan ET. Down-regulation of the expression of three major rat liver cytochrome P450s by endotoxin in vivo occurs independently of nitric oxide production. *J Pharmacol Exper Therap* 287(1) 352-358, 1998.
- Shapiro BH, Agrawal AK, et Pampori NA. Gender differences in drug metabolism regulated by growth hormone. *Int J Biochem Cell Biol* 27(1): 9-20, 1995.
- Shedlofsky SI, Israel BC, McClain CJ, Hill DB, et Blouin RA. Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J Clin Invest* 94(16) : 2209-2214, 1994.
- Shedlofsky SI, Tosheva RT, et Snawder JA. Depression of constitutive murine cytochromes P450 by staphylococcal enterotoxin B. *Biochem Pharmacol* 59(10): 1295-1303, 2000.
- Shelly MP, Mendel L, et Park GR. Failure of critically ill patients to metabolise midazolam. *Anaesthesia* 42(6): 619-626, 1987.
- Sheweita SA. Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr Drug Metab* 1(2): 107-132, 2000.

- Shimamoto Y, Kitamura H, Hoshi H, Kazusaka A, Funae Y, Imaoka S, Saito M, et Fujita S. Differential alterations in levels of hepatic microsomal cytochrome P450 isozymes following intracerebroventricular injection of bacterial lipopolysaccharide in rats. *Arch Toxicol* 72(8): 492-498, 1998.
- Sidhu JS et Omiecinski CJ. cAMP-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J Biol Chem* 270(21): 12762-12773, 1995.
- Sidhu JS et Omiecinski CJ. Forskolin-mediated induction of CYP3A1 mRNA expression in primary rat hepatocytes is independent of elevated intracellular cyclic AMP. *J Pharmacol Exper Therap* 276(1): 238-245, 1996.
- Sidhu JS et Omiecinski CJ. Insulin-mediated modulation of cytochrome P450 gene induction profiles in primary rat hepatocyte cultures. *J Biochem Mol Toxicol* 13(1), 1-9. 1999.
- Siewert E, Bort R, Kluge R, Heinrich PC, Castell J, et Jover R. Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent. *Hepatology* 32(1): 49-55, 2000.
- Silverman R. Treatment of acute asthma. A new look at the old and at the new. *Clin Chest Med* 21(2): 361-379, 2000.
- Simon AR, Rai U, Fanburg BL, et Cochran BH. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Cell Physiology* 275(6): C1640-C1652, 1998.
- Sonne J, Dossing M, Loft S, et Anderson PB. Antipyrine clearance in pneumonia. *Clin Pharmacol Ther* 37(6): 701-704, 1985.
- Stadler J, Trockfeld J, Schmalix WA, Brill T, Siewert JR, Greim H, et Doehmer J. Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3559-3563, 1994.
- Stamm WE. *Harrison's Principle of Internal Medicine* (Urinary tract infections and pyelonephritis, pages 548-554). K.J. Isselbacher, E. Braunwald J. D. Wilson J. B.

- Martin A. S. Fauci D. L. Kasper eds. 13^{ème} édition, 1994, Toronto, McGraw-Hill, Inc.
- Stanley LA, Adams DJ, Balkwill FR, Griffin D, et Wolf CR. Differential effects of recombinant interferon alpha on constitutive and inducible cytochrome P450 isozymes in mouse liver. *Biochem Pharmacol* 42(2): 311-320, 1991.
- Stanley LA, Adams DJ, Lindsay R, Meehan RR, Liao W, et Wolf CR. Potentiation and suppression of mouse liver cytochrome P-450 isozymes during the acute-phase response induced by bacterial endotoxin. *Eur J Biochem* 174(1): 31-36, 1988.
- Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Manns MP, et Trautwein C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cell Mol Biol* 47(4): 661-673, 2001.
- Sukhodub AL. Age-dependent changes in liver microsomal cytochrome P450. Literature compilation (http://www.icgeb.triestre.it/~p450srv/P450_ageing.html).
- Taylor BS, Alarcon LH, et Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry* 63(7): 766-781, 1998.
- Tian Y, Ke S, Denison M, Rabson AB, et Gallo MA. Ah receptor and NF-kappa B interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem* 274(1): 510-515, 1999.
- Tinel M, Elkahwaji J, Robin MA, Fardel N, Descatoire V, Haouzi D, Berson A et Pessayre D. Interleukin-2 overexpresses c-myc and down-regulates cytochrome P-450 in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exper Therap* 289(2): 649-655, 1999.
- Topfer F, Lenton LM, Bygrave FL, et Behm CA. Importance of T-cell-dependent inflammatory reactions in the decline of microsomal cytochrome P450 concentration in the livers of rats infected with *fasciola hepatica*. *Int J Parasitol* 25 : 1259-1262, 1995.
- Trenholme GM, Rieckmann KH, Frischer H, et Carson PE. Quinine disposition during malaria and during induced fever. *Clin Pharmacol Ther* 19(4): 459-467, 1976.

- van der Weide J et Steijns LS. Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. *Ann Clin Biochem* 36(Pt 6): 722-729, 1999.
- Walter-Sack I et Klotz U. Influence of diet and nutritional status on drug metabolism. *Clin Pharmacokinet* 31(1): 47-64, 1996.
- Wang Y, Ripperger J, Fey GH, Samols D, Kordula T, Wetzler M, Van Etten RA, et 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* 30(3): 682-697, 1999.
- Warren GW, Poloyac SM, Gary DS, Mattson MP, et Blouin RA. Hepatic cytochrome P-450 expression in tumor necrosis factor-alpha receptor (p55/p75) knockout mice after endotoxin administration. *J Pharmacol Exper Therap* 288(3): 945-950, 1999.
- Waterman MR et Estabrook RW. The induction of microsomal electron transport enzymes. *Mol Cell Biochem* 54 : 267-278, 1983.
- Watkins LR, Maier SF, et Goehler LE. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 63(3): 289-302, 1995.
- Whitlock JP, Jr. Induction of cytochrome P4501A1. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 39(1): 103-125, 1999.
- Wibbenmeyer LA, Lechner AJ, Muñoz CF, et Matuschak GM. Down-regulation of E.coli-induced TNF- expression in perfused liver by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 268: G311-G319, 1995.
- de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, et van den Anker JN. Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin Pharmacokinet* 36(6): 439-452, 1999.
- Williams SJ, Baird-Lambert JA, et Farrell GC. Inhibition of theophylline metabolism by interferon. *Lancet* 2(8565): 939-9341,1987.

- Williams SJ et Farrell GC. Serial antipyrine clearance studies detect altered hepatic metabolic function during spontaneous and interferon-induced changes in chronic hepatitis B disease activity. *Hepatology* 10(2): 192-197, 1989.
- Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC, et Nims RW. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys* 300(1): 115-123, 1993.
- Wright K et Morgan ET. Regulation of cytochrome P450IIC12 expression by interleukin-1 alpha, interleukin-6, and dexamethasone. *Mol Pharmacol* 39(4): 468-474, 1991.
- Wu T, Levine SJ, Lawrence MG, Logun C, Angus CW, et Shelhamer JH. Interferon-gamma induces the synthesis and activation of cytosolic phospholipase A2. *J Clin Invest* 93(2): 571-577, 1994.
- Yang CS. The organization and interaction of monooxygenase enzymes in the microsomal membrane. *Life Sci* 21(8) : 1047-1057 , 1997.
- Zhang ZY et Kaminsky LS. Characterization of human cytochromes P450 involved in theophylline 8-hydroxylation. *Biochem Pharmacol* 50(2) : 205-111, 1995.

Annexe

Résumé: 1^{er} manuscrit

Inactivation du cytochrome P450 par le sérum provenant d'humains atteints d'une infection virale et de lapins avec une inflammation induite par la térébenthine.

1. Le sérum provenant de patients atteints d'une infection virale des voies respiratoires supérieures et de lapins avec une réaction inflammatoire aiguë induite par la térébenthine réduit l'activité catalytique du cytochrome P450 hépatique (P450).
2. Les protéines contenues dans les sérums d'humains et de lapins ont été séparées par chromatographie selon leur poids moléculaire et les fractions recueillies testées pour leur capacité à diminuer l'activité et la quantité du P450 après quatre heures d'incubation avec des hépatocytes provenant de lapins injectés à la térébenthine (H_{INF}). Les sérums d'humains et de lapins diminuent l'activité du P450 d'environ 40%, sans changer la quantité de protéines des CYP1A1 et 1A2.
3. Dans le sérum de lapins, la fraction contenant des protéines de masses relatives (Mr) de 15 à 23 kDa diminue le contenu total en P450 de 41%, mais n'altère pas la quantité de protéines. L'anticorps anti-IL-6 ajouté à la fraction de Mr 15 à 23 kDa rétablit le contenu en P450 à 97% des valeurs témoins, tandis que l'anti-IL- 1β , l'anti-TFN α et l'anti-IFN γ ne produisent pas d'effet. Confirmant le rôle de

l'IL-6 dans la baisse d'activité du P450, l'incubation des H_{INF} avec l'IL-6 réduit en 4 heures le contenu en P450 de 40%.

4. Dans le sérum d'humains, la fraction contenant des protéines de M_r de plus de 95 kDa diminue de 43% le contenu en P450 sans modifier la quantité de protéines des CYP1A1 et 1A2. Les expériences de neutralisation de l'activité ont montré que IFN- γ , IL-6 et IL-1 β contribuent à la diminution du contenu en P450.
5. En conclusion, ces résultats démontrent que l'IL-6, et l'IFN- γ , l'IL-6 et l'IL-1 β sont les médiateurs sériques sécrétés *in vivo* dans l'inflammation induite par la térébenthine chez le lapin et dans l'infection virale des voies respiratoires supérieures chez l'humain, respectivement, et qui inactivent le P450.

Résumé: 2^{ème} manuscrit

Régulation négative du cytochrome P450 par le sérum provenant d'humains atteints d'une infection virale et de lapins avec une réaction inflammatoire.

Le sérum provenant d'humains avec une infection des voies respiratoires supérieures et de lapins avec une réaction inflammatoire aiguë induite par la térébenthine diminue l'activité du cytochrome P450 hépatique après 4 heures d'incubation. L'objectif de cette étude consistait à déterminer l'effet des sérums sur l'activité et l'expression du P450 après 24 heures d'incubation avec des hépatocytes provenant de lapins témoins (H_{CONT}) et avec une RIA (H_{INF}). Le sérum de lapins incubé avec des H_{CONT} durant 24 heures diminue le contenu et l'activité du P450, ainsi que la quantité de CYP3A6 par 45%, sans modifier la quantité des CYP1A1 et 1A2; lorsque incubé avec des H_{INF} , le sérum diminue l'activité et le contenu en P450 sans affecter la quantité des CYP1A1 et

1A2. Le sérum d'humains incubé durant 4 heures avec des H_{CONT} diminue l'activité du P450 sans changer la quantité des CYP1A1, 1A2 et 3A6, cependant, après 24 heures d'incubation, l'activité du P450 et la quantité du CYP3A6 sont diminuées. Le sérum d'humains incubé avec des H_{INF} durant 4 heures réduit le contenu et l'activité du P450; après 24 hr, l'activité et le contenu total en P450 sont diminués, ainsi que la quantité des CYP1A1 et 1A2. Cette étude démontre que a) l'effet du sérum de lapins avec une réaction inflammatoire aiguë et d'humains avec une infection virale dépend de la susceptibilité des hépatocytes, i.e. H_{CONT} ou H_{INF} ; b) la diminution de l'activité du P450 précède la régulation négative; c) la nature de la réaction inflammatoire détermine les répercussions sur l'activité et l'expression du P450; et d) le CYP3A6 est plus sensible que les CYP1A1 et 1A2 à la régulation négative provoquée par une réaction inflammatoire.

Résumé: 3^{ème} manuscrit

Modulation de l'expression des CYP1A1, 1A2 et 3A6 par le sérum provenant d'humains atteints d'une infection virale et de lapins avec une inflammation induite par la térébenthine.

L'inflammation diminue l'activité et l'expression du cytochrome P450 (P450) hépatique, ce qui affecte le métabolisme d'une grande variété de composés endogènes et de xénobiotiques, avec des conséquences sur l'activité pharmacologique et la toxicité. L'objectif de cette étude est d'identifier les médiateurs sériques responsables de la régulation négative des isoformes du P450 durant une infection virale chez l'humain et dans un modèle d'inflammation aseptique. L'incubation d'hépatocytes de lapins avec des sérums provenant de lapins avec une réaction inflammatoire induite par la térébenthine ou

d'humains avec une infection des voies respiratoires supérieures diminue en 48 heures les niveaux d'ARNm des CYP1A1, 1A2 et 3A6 et la quantité de protéines correspondantes. La séparation des protéines sériques selon le poids moléculaire a montré que la fraction contenant des protéines de Mr de 15 à 31 kDa est responsable de la régulation négative du P450. L'immuno-neutralisation des cytokines candidates a démontré que durant une inflammation aseptique, l'IL-6, et à un plus faible niveau l'IL-1 β , sont impliqués dans la régulation négative des isoformes du P450. Dans le sérum d'humains avec une infection virale, IL-1 β , IL-6, IFN- γ et le TNF- α contribuent à la répression des isoformes du P450. Les CYP1A1 et 1A2 semblent régulés par les médiateurs sériques au niveau transcriptionnel, tandis que le CYP3A6 apparaît être sous le contrôle de mécanismes pré et post-transcriptionnels.