

Université de Montréal

**MODULATION DE L'EXPRESSION ET DE
L'ACTIVITÉ DE LA NADPH P450
RÉDUCTASE CHEZ LE LAPIN.**

Par

Guillaume Dumais

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

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

Août 2011

© Guillaume Dumais, 2011

MODULATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITÉ DE
LA NADPH P450 RÉDUCTASE CHEZ LE LAPIN.

Mémoire évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Vincent Pichette, président rapporteur
Dr. Patrick du Souich, directeur de recherche
Dr. Richard Momparler, membre du jury

© Guillaume Dumais, août 2011

Département de pharmacologie
Université de Montréal

RÉSUMÉ

L'activité catalytique du cytochrome P450 dépend de la disponibilité d'électrons produits par la NADPH P450 réductase (NPR). Notre étude a pour but de déterminer comment l'expression de la NPR est modulée chez le lapin.

Afin de comprendre comment l'expression de la NPR est modulée, des hépatocytes de lapins témoins ont été incubés pendant 2, 4, 24 et 48 heures en présence de plusieurs activateurs de facteurs de transcription connus du cytochrome P450. De plus, des lapins ayant reçu une injection sous-cutanée de térébenthine afin de produire une réaction inflammatoire aseptique sont sacrifiés 48 heures plus tard dans le but d'étudier les effets de l'inflammation sur l'expression de la NPR.

La rosiglitazone, le fénofibrate, l'acétate de plomb et le chlorure de cobalt (des inducteurs des PPAR γ , PPAR α , AP-1 et HIF-1), après 48 heures d'incubation, n'ont provoqué aucun changement d'expression ou d'activité de la NPR. Après 48 heures d'incubation, la dexaméthasone (Dexa) a augmenté la quantité d'ARNm (QT-PCR), l'expression et l'activité de la NPR ($p < 0,05$), en plus d'augmenter l'ARNm des récepteurs nucléaires CAR (récepteur constitutif à l'androstane) et PXR (récepteur X prégnane) ($p < 0,05$). Le phénobarbital (PB) a augmenté seulement l'activité de la NPR ($p < 0,05$). Par contre, après 48 heures d'incubation, la combinaison PB et Dexa a augmenté la quantité d'ARNm, ainsi que l'expression et l'activité de la NPR ($p < 0,05$). La combinaison de PB et Dexa a induit une augmentation d'ARNm des récepteurs nucléaires CAR, PXR et RXR α (récepteur X du rétinoïde) plus précocement, soit après 2 heures d'incubation ($p < 0,05$). Le PD098059 (PD), un bloqueur de l'activation de MAPK1 (mitogen-activated protein

kinase), et l'acide okadaïque (OA), un inhibiteur de la protéine phosphatase 2A (PP2A), ont bloqué l'augmentation d'expression et d'activité de la NPR induite par le PB après 48 heures d'incubation. La réaction inflammatoire aseptique a diminué l'expression et l'activité de la NPR après 48 heures d'incubation ($p < 0.05$).

On conclue que la dexaméthasone et le phénobarbital sont des inducteurs potentiels de la NPR et que les voies de signalisation de CAR, PXR et RXR semblent être impliquées dans le contrôle de cette induction. Des études supplémentaires devront être complétées afin de confirmer ces résultats préliminaires.

Mots-clés : Cytochrome P450, NADPH P450 réductase, hépatocytes, inflammation, PPAR γ , PPAR α , AP-1, HIF-1, dexaméthasone, phénobarbital, CAR, PXR, RXR α , MAPK1, protéine phosphatase 2A.

ABSTRACT

The catalytic activity of the cytochrome P450 depends on the availability of electrons produced by the NADPH P450 reductase (NPR). Our study aims to determine how the expression of the NPR is modulated in rabbits.

In order to understand how the expression of the NPR is modulated, hepatocytes from rabbits in the control group were incubated for 2, 4, 24 and 48 hours in the presence of several cytochrome P450 transcription factor activators. Furthermore, a group of rabbits received a sub-cutaneous injection of turpentine in order to create an aseptic inflammatory response with the aim to assess the effects of inflammation on the expression of the NPR.

Rosiglitazone, fenofibrate, lead acetate and cobalt chloride (inducers of PPAR γ , PPAR α , AP-1 and HIF-1) did not produce any change in the expression or the activity of the NPR after a 48 hour incubation period. Dexamethasone (Dexa) increased the amount of mRNA (QT-PCR), and NPR's expression and activity as well as CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) nuclear receptors' mRNA after a 48 hour incubation period ($p < 0.05$). Phenobarbital (PB) increased NPR's activity ($p < 0.05$). However, the combination of PB and Dexa increased the amount of mRNA, as well as NPR's expression and activity after a 48 hour incubation period ($p < 0.05$). The combination of PB and Dexa increased CAR, PXR and RXR α (retinoid X receptor) nuclear receptors' mRNA after a 2 hour incubation period. PD098059 (PD), a inhibitor of MAPK1 (mitogen-activated protein kinase) activation, and okadaic acid (OA), an inhibitor of the phosphatase 2A protein (PP2A), prevented the increase of NPR

expression and activity induced by PB after a 48 hour incubation period. The aseptic inflammatory reaction decreased NPR's expression and activity after a 48 hour incubation period ($p < 0.05$).

We conclude that dexamethasone and phenobarbital are potential NPR inducers and that CAR, PXR and RXR signaling pathways appear to be involved in controlling this induction. However, further studies will be needed to confirm these preliminary results.

Key words: Cytochrome P450, NADPH P450 reductase, hepatocytes, inflammation, PPAR γ , PPAR α , AP-1, HIF-1, dexamethasone, phenobarbital, CAR, PXR, RXR α , MAPK1, phosphatase 2A protein.

Table des matières

RÉSUMÉ	5
TABLE DES MATIÈRES	9
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	16
REMERCIEMENTS	20
A. INTRODUCTION	21
a. LA BIOTRANSFORMATION DES MÉDICAMENTS	
b. LE CYTOCHROME P450	
2.1 DÉFINITION ET HISTORIQUE	
2.2 NOMENCLATURE DES CYP	
2.3 STRUCTURE DES CYP	
2.4 FONCTIONS DES CYP	
2.4.1 SUBSTRATS EXOGÈNES	
2.4.2 SUBSTRATS ENDOGÈNES	
2.5 POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE DES CYP	
2.6 RÉGULATION DES CYP	
2.6.1 INDUCTION DES CYP	
2.6.1.1 CAR	
2.6.1.2 PXR	
2.6.1.3 GR	
2.6.1.4 PPAR	
2.6.1.5 HIF-1 ET AP-1	
2.6.2 INHIBITION DES CYP	
2.6.2.1 INHIBITION RÉVERSIBLE DES CYP	
2.6.2.2 INHIBITION IRRÉVERSIBLE DES CYP	
2.6.2.3 INHIBITION PAR DIMINUTION D'EXPRESSION	
c. LA NADPH P450 RÉDUCTASE	
i. DÉFINITION ET HISTORIQUE DE LA NPR	
ii. STRUCTURE DE LA NPR	
iii. RÔLES DE LA NPR	
iv. RÉGULATION DE LA NPR	
d. INLFAMMATION	
4.1 DÉFINITION	
4.2 COMPOSANTES CELLULAIRES DE L'INFLAMMATION	

4.3 IMPACTS DE L'INFLAMMATION SUR LES CYP
4.4 IMPACTS DE L'INFLAMMATION SUR LA NPR

B. MATÉRIELS ET MÉTHODES	59
a. ISOLEMENT DES HÉPATOCYTES	
b. MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA NPR	
c. MESURE DE L'ACTIVITÉ DU CYP3A6	
d. MESURE DE L'EXPRESSION	
e. ISOLEMENT DE L'ARNm DANS LES HÉPATOCYTES	
f. ANALYSES STATISTIQUES	
g. MATÉRIELS	
C. RÉSULTATS	69
D. DISCUSSION	97
E. BIBLIOGRAPHIE	111

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure secondaire et tertiaire du cytochrome P450

Figure 2. Cycle catalytique des CYP

Figure 3. Représentation de la contribution des isoformes des CYP en fonction du nombre de substrats exogènes biotransformés

Figure 4. Métabolisme du cholestérol

Figure 5. Synthèse des éicosanoïdes

Figure 6. Histogramme du ratio de la débrisoquine sur son métabolite dans une population typique caucasienne montrant les trois phénotypes

Figure 7. Voie d'activation induite par le PB de la transcription de CYP par CAR.

Figure 8. Voie d'activation de la transcription de CYP par PXR.

Figure 9. Structure secondaire et tertiaire de la NPR

Figure 10. Transfert d'électrons de la NPR aux CYP.

Figure 11. Interaction NPR/CYP.

Figure 12. Expression de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 50 μM de rosiglitazone (Rosi), 100 μM de fénofibrate (Feno), 150 μM de chlorure de cobalt (CoCl_2) et 10 μM d'acétate de plomb (Lead). N= 6 par groupe.

Figure 13. Activité de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 50 μM de rosiglitazone (Rosi), 100 μM de fénofibrate (Feno), 150 μM de chlorure de cobalt (CoCl_2) et 10 μM d'acétate de plomb (Lead). N= 6 par groupe.

Figure 14. Expression du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 50 μM de rosiglitazone (Rosi), 100 μM de fénofibrate (Feno), 150 μM de chlorure de cobalt (CoCl_2) et 10 μM d'acétate de plomb (Lead). N= 6 par groupe. *p < 0,05 comparé à Cont.

Figure 15. Activité du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 50 μ M de rosiglitazone (Rosi), 100 μ M de fénofibrate (Feno), 150 μ M de chlorure de cobalt (CoCl_2) et 10 μ M d'acétate de plomb (Lead). N= 6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

Figure 16. Activité de la NPR exprimée en molécules de cytochrome c réduites par minute par 10^6 cellules par μ g/ml de protéines mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans phénobarbital (PB). N=1.

Figure 17. Quantité d'ARNm de la *NPR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles (Cont) après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont. & p <0,05 comparé à Dexa.

Figure 18. Expression de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

Figure 19. Activité de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont. & p <0,05 comparé à Dexa.

Figure 20. Quantité d'ARNm du *CYP3A6* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont. & p <0,05 comparé à Dexa.

Figure 21. Expression du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

Figure 22. Activité du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont. & p <0,05 comparé à Dexa.

Figure 23. Quantité d'ARNm de *CAR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

Figure 24. Quantité d'ARNm de *PXR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

Figure 25. Quantité d'ARNm de *RXR α* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe.

Figure 26. Quantité d'ARNm de *PP2A* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe.

Figure 27. Quantité d'ARNm de la *NPR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

Figure 28. Expression de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – CONT) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

Figure 29. Activité de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – CONT) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

Figure 30. Quantité d'ARNm du *CYP3A6* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

Figure 31. Expression du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – CONT) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

Figure 32. Activité du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – CONT) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

Figure 33. Quantité d'ARNm de *CAR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

Figure 34. Quantité d'ARNm de *PXR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

Figure 35. Quantité d'ARNm de *RXR α* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

Figure 36. Quantité d'ARNm de *PP2A* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe.

Figure 37. Expression de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans dexaméthasone (Dexa), phénobarbital (PB), PD098059 (PD), acide okadaïque (AO) ou leur combinaison. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

Figure 38. Activité de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans dexaméthasone (Dexa), phénobarbital (PB), PD098059 (PD), acide okadaïque (AO) ou leur combinaison. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

Figure 39. Expression du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans dexaméthasone (Dexa), phénobarbital (PB), PD098059 (PD), acide okadaïque (AO) ou leur combinaison. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

Figure 40. Activité du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans dexaméthasone (Dexa), phénobarbital (PB), PD098059 (PD), acide okadaïque (AO) ou leur combinaison. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

Figure 41. Expression de la NPR exprimée en unités arbitraires de densité mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles (CONT) et de lapins avec une réaction inflammatoire (INFLA) après 48 heures d'incubation. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

Figure 42. Activité de la NPR exprimée en molécules de cytochrome c réduites par minute par 10^6 cellules par $\mu\text{g/ml}$ de protéines mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles (CONT) et de lapins avec une réaction inflammatoire (INFLA) après 48 heures d'incubation. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

Figure 43. Expression du CYP3A6 exprimée en unités arbitraires de densité mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles (CONT) et de lapins avec une réaction inflammatoire (INFLA) après 48 heures d'incubation. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

Figure 44. Activité du CYP3A6 exprimée en fluorescence du DFB mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles (CONT) et de lapins avec une réaction inflammatoire (INFLA) après 48 heures d'incubation. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

Figure 45. Schéma résumant la réponse cellulaire intégrée responsable de la modulation de la NPR.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

AhR : récepteurs des aryl-hydrocarbures

AINS : anti-inflammatoires non-stéroïdiens

AP-1 : Protéine activatrice 1

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

Arnt : facteur de translocation nucléaire des AhR

BCA : acide bicinchoninique

CAR : récepteur constitutif à l'androstane

CCRP: cytoplasmic CAR retention protein

CO : monoxyde de carbone

CoCl₂ : chlorure de cobalt

Cont : contrôle

CYP : cytochrome P450

Dexa : dexaméthasone

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

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

DR : répétitions directes

EBP: enhancer binding protein

EGTA : éthylène glycol tétra acétate

EPO : érythropoïétine

ER : éléments de réponse

ERK: extracellular signal-regulated kinases

FAD : flavin adenine dinucleotide

Feno: fénofibrate

FMN : flavin mononucleotide

GR : récepteur aux glucocorticoïdes

GREs : éléments de réponse aux glucocorticoïdes

HIF-1: Hypoxia-inducible factor 1

HSP90: heat shock protein 90

HRE : éléments de réponse à l'hypoxie

Ig : immunoglobuline

IL : interleukines

IRIC : Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie

IVRS : infection des voies respiratoires supérieures

JAK : Janus kinase

JNK : c-Jun N-terminal kinase

kDa : kilodaltons

Lead acetate: acétate de plomb

L-NAME : N-nitro-L-arginine méthyl ester

LPS : lipopolysaccharides

MI : métaboliseurs intermédiaires

miRNA : microRNA

ML : métaboliseurs lents

MR: métaboliseurs rapides

NADPH : nucléotide adénine di-phosphate

NF- κ B: nuclear factor kappa B

NO : monoxyde d'azote

NPR : NADPH P450 réductase

NR1 : Novel reductase 1

OA: acide okadaïque

p38MAPK: mitogen-activated protein kinase p38

PB : phénobarbital

PBREM : élément de réponse au phénobarbital

PBS : *phosphate* buffered saline

PCR : protéine C-réactive

PD : PD098059

PGI : prostacycline

PI₃K : phosphatidylinositide 3-kinase

PKC : protéine kinase C

PPA : protéines de phase aiguë

PP2A : protéine phosphatase 2A

PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor

PPRE: peroxisome proliferator hormone response elements

PXR : récepteur X prégnane

QT-PCR : quantitative polymerase chain reaction

RI : réaction inflammatoire

ROS : espèces réactives de l'oxygène

Rosi: rosiglitazone

RXR: récepteur X du rétinoïde

SDS-PAGE : sodium dodécyle sulfate/ polyacrylamide

SNP : single nucleotid polymorphism

TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

TR : récepteurs aux hormones thyroïdiennes

TXA : thromboxane

TXA₂ : thromboxane A₂

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr. Patrick du Souich, sans qui ce travail n'aurait pu être possible. Par sa passion pour la pharmacologie, sa dévotion totale envers ses étudiants et son éthique de travail irréprochable, Patrick a su me guider au cours de mon cheminement à travers les obstacles et les difficultés de la recherche. Je le remercie également pour ces longues discussions dans son bureau à parler de cytochromes et pour sa patience sans limite. Je tiens aussi à remercier Lucie Héroux, notre technicienne de laboratoire, qui m'a fait découvrir les joies de la chirurgie. Toujours prête à dépanner lorsque quelque chose ne tournait pas rond, elle s'impliquait à fond dans nos projets et travaillait avec acharnement. Son aide fut indispensable au bon fonctionnement de mes recherches.

Un merci tout spécial aux autres étudiants du laboratoire. Tout d'abord, Mariève Dupuis qui m'a tenu sous son aile pour les premiers mois et qui a passé beaucoup de temps à m'apprendre les différentes techniques et protocoles. Mélanie Gabriac et Mirela Iovu pour leur support et finalement, Marc Vallières pour son amitié et pour les nombreuses heures partagées à discuter et rire entre deux expériences ! Je remercie ma famille, mon père, ma mère et ma petite sœur pour leur soutien constant et leur amour. Merci également à mon grand-père, le Dr. Bertrand Dumais, pour son aide à la rédaction et surtout pour le modèle exemplaire qu'il représente à mes yeux. Finalement, merci à mes amis qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont permis d'atteindre mes objectifs tout en profitant à fond de la vie.

A. Introduction

Avant le XVIII^e siècle, l'usage de drogues à des fins thérapeutiques était limité. Ce n'est qu'à partir de la fin de ce siècle que certains scientifiques commencèrent à utiliser des modèles expérimentaux chez l'animal afin d'étudier l'effet des drogues sur l'humain (Chast, 2002). Depuis ce jour, de nombreuses découvertes ont été faites et l'utilisation de médicaments à base de molécules synthétiques ne cesse d'augmenter. La pharmacologie constitue désormais le traitement de base pour combattre les maladies et il devient donc primordial de mieux comprendre leur impact sur le corps humain.

1. La biotransformation des médicaments

La biotransformation des médicaments désigne les diverses modifications chimiques que subissent les médicaments dans l'organisme pour produire des métabolites. Certains médicaments ne subissent aucune biotransformation dans l'organisme et sont éliminés sans modification, mais la grande majorité génère un ou plusieurs métabolites. Chaque métabolite formé à partir d'une même molécule peut être plus ou moins actif et plus ou moins toxique que le médicament administré. Le métabolite peut même posséder des propriétés qui diffèrent, voir même antagonistes, et avoir ses propres caractéristiques pharmacocinétiques (Allain, 2000). On distingue deux phases de biotransformation, les phases I et II. La phase I comprend les biotransformations dont le mécanisme réactionnel implique une oxydation. Un très grand nombre de ces réactions d'oxydation sont catalysées par les enzymes du cytochrome P450 (CYP) et nécessitent la présence de nucléotide adénine di-phosphate (NADPH). La majorité des enzymes impliqués dans la phase I se retrouvent ancrés sur les membranes du réticulum endoplasmique. La phase II comprend les réactions de conjugaison. Parmi ces réactions de conjugaison, on dénote la

glucuronidation, la sulfation, l'acétylation, la méthylation, ainsi que des réactions de conjugaison au glutathion et aux acides aminés (Allain, 2000). La plupart des enzymes de phase II sont cytosoliques, sauf l'enzyme UDP-GT de la glucuronidation qui se trouve au niveau du réticulum endoplasmique (Parkinson, 1995). La grande majorité des réactions de phase I et de phase II vont modifier la structure de la molécule afin d'augmenter son hydrophilicité pour ainsi favoriser son excrétion biliaire et urinaire.

2. Le cytochrome P450

2.1 Définition et historique

Le cytochrome P450 constitue une superfamille d'enzymes hémoprotéiques très diversifiées qui permettent l'oxydation d'une large gamme de substrats (Phase I). Les premières preuves expérimentales concernant les CYP furent observées en 1955 lorsque les groupes d'Axelrod et de Brodie ont identifié un système d'enzymes dans le réticulum endoplasmique du foie capable d'oxyder des xénobiotiques (Axelrod, 1955 ; Brodie et coll., 1955). Puis, alors qu'ils étudiaient les pigments des microsomes du foie, Garfinkel et Klingenberg ont détecté en 1958 un pigment formant un complexe avec le monoxyde de carbone et émettant un pic d'absorption à 450 nm (Klingenberg, 1958). Plus tard, en 1962, on élucida la nature hémoprotéique de ce pigment qu'on nomma alors cytochrome P450 (Omura et Sato, 1964). Ce nom fait référence à trois caractéristiques : leur liaison aux membranes à l'intérieur de la cellule « cyto », leur pigment hème « chrome et P » et finalement, « 450 », pour la longueur d'onde à laquelle ils absorbent la lumière en présence du monoxyde de carbone (Lynch et Price, 2007).

2.2 Nomenclature des CYP

Chacun des enzymes du cytochrome P450 correspond à un isoforme puisque tous proviennent de gènes différents (Cupp et Tracy, 1998). Chez les mammifères, on compte 18 familles, 43 sous-familles et 136 isoformes. La nomenclature des CYP se base sur les séquences d'acides aminés communes entre les différents isoformes. Chaque isoforme débute par le préfixe « CYP », représentant « cytochrome P450 », et est suivi d'un premier chiffre arabe correspondant à la famille, d'une lettre majuscule pour la sous-famille puis d'un autre chiffre arabe pour représenter le gène individuel dans la sous-famille (ex. CYP2D6) (Nelson et coll., 1996). On observe une homologie de 40 % entre les séquences d'acides aminés des protéines d'une même famille et 55 % entre celles d'une même sous-famille et 70% entre les isoformes de la même sous-famille (Chang et Kam, 1999).

2.3 Structure des CYP

Les CYP sont formés au niveau structural par des chaînes simples de polypeptides d'un variant de 40 à 58 kDa (Poulos, 2005). La structure topographique secondaire des hélices alpha et des feuillets bêta d'un CYP est indiquée dans la figure 1a. Le domaine bêta est composé principalement de plusieurs feuillets bêta, représentés par les flèches et entourés par des lignes pointillées. Le domaine alpha se compose de plusieurs replis de type hélice alpha représentés par les rectangles bleus. Les CYP contiennent un groupement prosthétique hème (en rouge au centre de la figure 1b) qui, par son atome de fer, permet l'oxydation du substrat (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). La couleur jaune correspond au site de liaison du substrat. En général, les structures plus rapprochées de

l'élément prosthétique hème sont les plus conservées, comme les hélices I et L par exemple, qui sont en contact direct avec l'hème. L'hélice I joue un rôle très important puisqu'elle change de conformation suite à la liaison du substrat dans la poche lipophile permettant ainsi l'emprisonnement du substrat dans le site actif de l'enzyme. À l'inverse, les régions qui contrôlent la reconnaissance spécifique du substrat sont celles qui diffèrent le plus parmi les différentes familles des CYP (Poulos, 2005). Contrairement aux CYP chez les procaryotes, ceux des eucaryotes se retrouvent principalement ancrés à la membrane du réticulum cytoplasmique via une boucle d'ancrage représentée par la lettre N de la figure 1b.

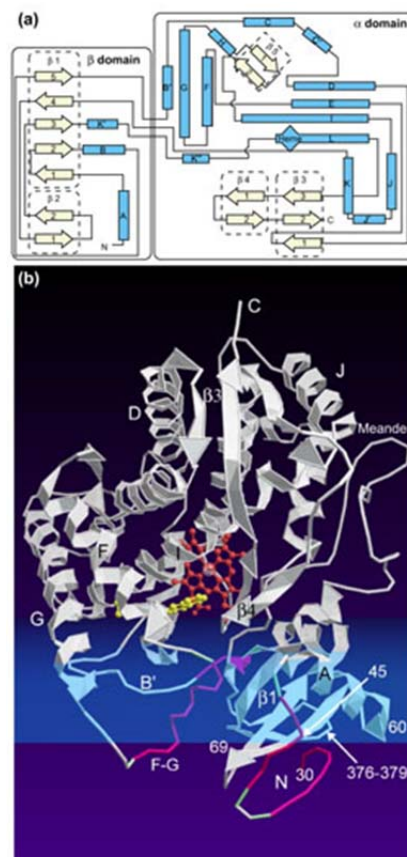


Figure 1. Structure secondaire (a) et tertiaire (b) du cytochrome P450

Source : <http://genomebiology.com/2000/1/6/reviews/3003>

2.4 Fonctions des CYP

Les CYP participent à la synthèse de composés endogènes, à la biotransformation et au catabolisme de composés endogènes en plus de diminuer la lipophilicité de composés exogènes (Phase I). Les réactions de monooxygénation catalysées par les CYP peuvent être décrites de la façon suivante :



La monooxygénation consiste au transfert d'un atome d'oxygène au substrat. Le second atome d'oxygène mène dans le cas présent à la formation d'eau (Katzung, 2004). Le cycle catalytique de l'enzyme comporte 9 étapes comme le démontre la figure 2.

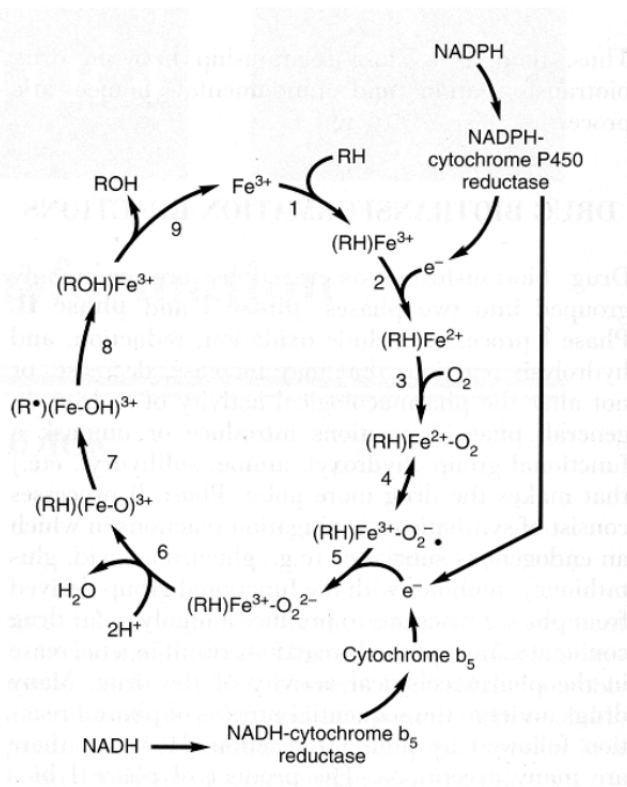


Figure 2. Cycle catalytique des CYP

Le cycle est initié par la liaison du substrat (RH) sur l'atome de fer du groupement prosthétique de l'enzyme (étape 1). Au repos, l'enzyme contient du fer à l'état ferrique (Fe^{3+}) et ne peut pas fixer l'oxygène. L'étape 2 consiste à la réduction du fer de l'état ferrique (Fe^{3+}) à l'état ferreux (Fe^{2+}) en captant un électron provenant de la NADPH P450 réductase (NPR). L'oxygène se fixe ensuite à l'atome de fer pour former le complexe $(\text{RH})\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ (étape 3). L'étape 4 consiste à la réorientation d'un électron du fer ferreux (Fe^{2+}) afin de réduire l'oxygène et former le complexe $(\text{RH})\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^{\cdot}$. Puis, le transfert d'un deuxième électron provenant cette fois-ci du cytochrome b_5 active l'oxygène (étape 5). La protonation et la formation du produit Fe^{3+} -oxène réactif constitue l'étape 6. L'étape 7 suit avec la transposition d'un atome d'hydrogène du substrat à un atome d'oxygène formant ainsi un groupement hydroxyle (OH). Le cycle catalytique se termine par la recombinaison du groupement hydroxyle avec les carbones du substrat (étape 8) et la dissociation de ce substrat hydroxylé (ROH) du noyau de fer (Guengerich, 2007). Un rapport CYP/NPR de 1 :2 dans la cellule permet l'activité maximale de l'enzyme (Yamazaki et coll., 1996). Des études ont cependant démontré des rapports de 10 :1 ou même de 20 :1 dans les microsomes du foie (Estabrook et coll., 1971). Les étapes 2 et 5 sont donc les étapes limitantes de la biotransformation des substrats puisque l'apport en électrons est essentiel au fonctionnement de l'enzyme (Guengerich, 2002). Dans le cas d'un apport insuffisant d'électrons, le cycle catalytique est bloqué ainsi que l'oxydation des substrats et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En absence de substrat à oxyder, le cycle catalytique est toujours fonctionnel et génère des ROS (Zangar et coll., 2004).

2.4.1 Substrats Exogènes

Comme mentionné précédemment, une fois absorbés dans l'organisme, les médicaments peuvent être excrétés sans modification, mais la plupart subissent des réactions chimiques qui facilitent leur clairance. Cette biotransformation peut donc être perçue comme un mécanisme de protection de l'organisme en favorisant l'élimination de médicaments. Pour ce qui est des biotransformations de phase I des xénobiotiques, ces réactions sont en grande majorité effectuées par les enzymes du cytochrome P450 et impliquent surtout trois familles, les CYP1, CYP2 et CYP3 (van der Weide et Steijns, 1999). Les réactions d'oxydation se produisent principalement au niveau du foie, mais également au niveau de l'intestin, du cerveau, des poumons, des reins et de la peau. Chaque isoforme de ces trois familles de CYP possède des substrats spécifiques, mais également des molécules qui diminuent ou augmentent son activité catalytique. Certains xénobiotiques peuvent être métabolisés par plus d'un isoforme, et les isoformes peuvent métaboliser plus d'un xénobiotique ce qui peut éventuellement mener à des interactions médicamenteuses. Parmi les isoformes les plus importants, on note le CYP1A2 qui compte pour environ 15 % du contenu total des CYP dans le foie humain (Figure 3) (Guengerich, 2003). Cet isoforme, retrouvé uniquement au niveau du foie (Wijnen et coll., 2007), métabolise les amines aromatiques et hétérocycliques (Landi et coll., 1999), mais est surtout connu pour la biotransformation de la caféine et du 17β -oestradiol après sa conversion initiale de l'estrone (Hong et coll., 2004). On note également le CYP2C9 qui représente environ 20 % du contenu total des CYP dans le foie humain (Guengerich, 2003). Celui-ci joue un rôle important dans le métabolisme des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) tels l'ibuprofène ou le celecoxib (Pilotto et coll., 2007) et est aussi responsable du

métabolisme de la warfarine et des antidiabétiques oraux (Limdi et Veenstra, 2008). Un autre isoforme important des CYP est le CYP2D6. Bien qu'il ne représente qu'environ 5 % des CYP du foie humain, cet isoforme est responsable du métabolisme de 20 à 30 % des médicaments sur le marché. Parmi ceux-ci, on dénote certains antipsychotiques et antihypertenseurs, les β -bloquants, la débrisoquine, le tamoxifène et les antidépresseurs tricycliques (Yu et coll., 2004). Enfin, le CYP3A4 est certainement l'isoforme le plus important tant au niveau de son contenu dans le foie qu'au niveau du nombre de médicaments qu'il biotransforme, soit environ 50 % des médicaments sur le marché (Michalets, 1998). La cyclosporine, l'amiodarone, les antagonistes des canaux calciques, la carbamazépine, le losartan, le midazolam, l'érythromycine, la lidocaïne, l'imipramine, les statines, l'indinavir, le tacrolimus, etc. font partie des nombreux substrats du CYP3A4 (Parkinson, 1996).

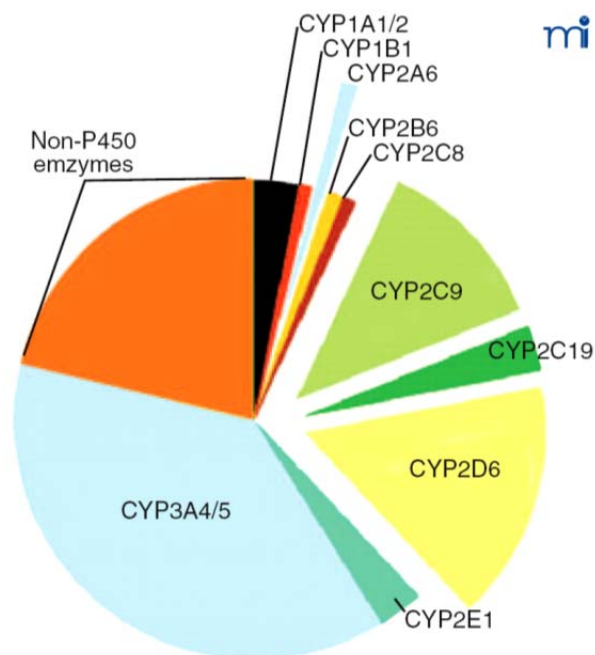


Figure 3. Représentation de la contribution des isoformes des CYP en fonction du nombre de substrats exogènes biotransformés (Guengerich, 2003).

2.4.2 Substrats Endogènes

En plus de diminuer la lipophilicité de composés exogènes, les CYP participent également à la synthèse, à la biotransformation ainsi qu'au catabolisme de composés endogènes. Le cholestérol, ce lipide de la famille des stérols qui constitue un composant majeur des membranes cellulaires en contribuant à leur stabilité et au maintien de leurs structures (Steinberg et coll., 1989), est l'un des substrats endogènes des CYP. Il est le précurseur de plusieurs molécules comme la vitamine D, les hormones stéroïdiennes et les acides biliaires. Luoma et ses collaborateurs avaient d'abord observé que les concentrations plasmatiques de cholestérol dans les lipoprotéines de petite densité (LDL) diminuaient lorsque l'activité des CYP augmentait (Luoma et coll., 1983). On démontra plus tard que les CYP jouent un rôle autant dans la synthèse du cholestérol à partir de l'acétyl-CoA que dans sa transformation pour former les acides biliaires et les stéroïdes (Figure 4, Pikuleva, 2006).

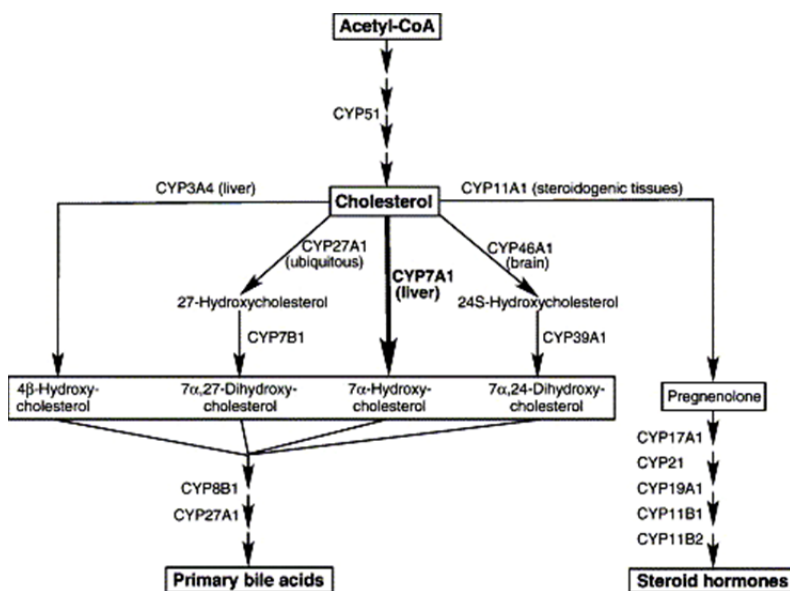


Figure 4. Métabolisme du cholestérol (Pikuleva, 2006)

Les CYP participent également à la synthèse des éicosanoïdes en contribuant à la formation des leucotriènes, du thromboxane A₂ et de la prostacycline I₂. Ceux-ci sont des métabolites de l'acide arachidonique formés à partir des phospholipides membranaires par l'action d'enzymes appelées phospholipases (Figure 5). Ces éicosanoïdes liposolubles jouent un rôle primordial dans l'homéostasie cardiovasculaire (Elbekai et El-Kadi, 2006). Le CYP5A1 et le CYP8A1, respectivement appelés thromboxane synthétase (TXA synthase) et prostacycline synthétase (PGI synthase), sont responsables de la synthèse de la thromboxane A₂ (TXA₂) et de la prostacycline (PGI₂).

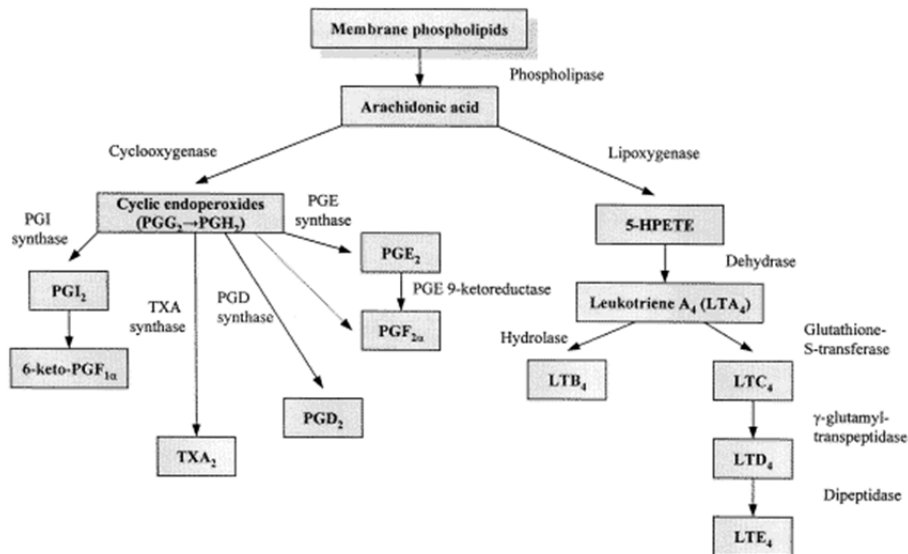


Figure 5. Synthèse des éicosanoïdes (Bhargava et coll., 1998)

Lors d'une réaction inflammatoire, les prostaglandines sont sécrétées en grande quantité au niveau du site d'inflammation. Elles activent la réponse inflammatoire et sont responsables de la fièvre et de la douleur (Katzung, 2004). Le TXA₂ est un puissant vasoconstricteur qui en plus favorise la coagulation sanguine et la formation de thrombus en activant l'agrégation des plaquettes (Rang et coll., 2003). À l'inverse, la PGI₂ a des

effets opposés à la TXA₂ en provoquant une vasodilatation et en empêchant l'agrégation des plaquettes (Parkington et coll., 2004). Les leucotriènes sont responsables en grande partie des symptômes de l'asthme, soit la production de mucus, la bronchoconstriction ainsi que l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Ogawa et Calhoun, 2006). Les CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2, CYP4A11, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3 et CYP4F8 participent également à la formation des leucotriènes, du thromboxane A₂, de la prostacycline I₂, des acides époxyeicosatriénoïques (EETs) et des acides hydroxy-eicosatétraénoïques (HETEs). Enfin, l'action enzymatique des CYP est également nécessaire afin de permettre à l'organisme de synthétiser la vitamine D à partir du cholestérol. Une fois produite dans la peau suite à l'exposition au soleil, la vitamine D₃ (cholécalférol) doit être transformée dans sa forme active par les CYP27A1, CYP24A1 et CYP27B1 afin d'exercer ses fonctions métaboliques d'absorption de calcium et de phosphore (Guengerich, 2003).

2.5 Polymorphisme génétique des CYP

Le polymorphisme génétique peut être défini comme étant une variation des caractères génétiques au sein d'une même population (Clark, 1976). Cette variation est causée par des mutations dans les séquences nucléotidiques de l'ADN des gènes à travers une population. Un gène est dit « polymorphe » lorsqu'il existe au moins deux allèles à une fréquence égale ou supérieure à 1 %. La nature polymorphique des CYP influence de façon importante la réponse individuelle aux médicaments, les interactions médicamenteuses, ainsi que l'apparition d'effets secondaires (Wang et coll., 2009). En effet, dû à ces différences alléliques, causées en majorité par des polymorphismes d'un

seul nucléotide (SNP pour « single nucleotid polymorphism »), la capacité métabolique des CYP peut différer d'un individu à l'autre (Buzkova et coll., 2006). Conséquemment, le métabolisme du médicament (phase I) et du même coup, son élimination seront modifiés (van der Weide et Steijns, 1999).

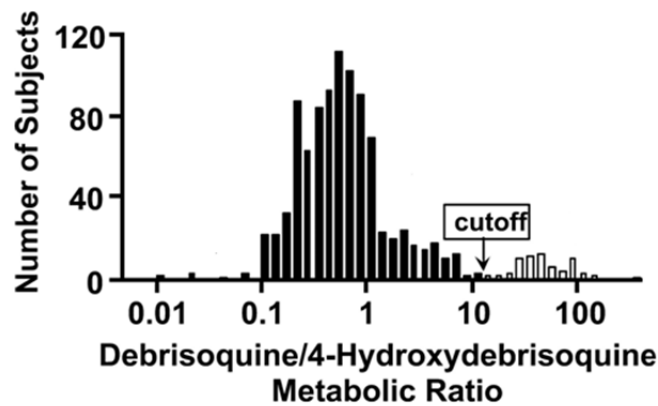


Figure 6. Histogramme du ratio de la débrisoquine sur son métabolite dans une population typique caucasienne montrant les trois phénotypes (Caldwell, 2004).

Pour certains médicaments, on distingue plusieurs phénotypes différents. Un exemple bien connu de polymorphisme génétique des CYP est celui du CYP2D6, un isoforme impliqué dans le métabolisme de plus de 40 médicaments largement prescrits sur le marché (van der Weide et Steijns, 1999). Le gène codant pour l'enzyme débrisoquine-4-hydroxylase (CYP2D6), localisé sur le chromosome 22 chez l'humain, est hautement polymorphique et divise la population en trois classes phénotypiques : les métaboliseurs lents (ML), les métaboliseurs intermédiaires (MI) et les métaboliseurs rapides (MR) (Figure 6) (Lynch et Price, 2007). Les individus ML présentent une activité enzymatique du CYP2D6 réduite et donc, des concentrations plasmatiques de la substance mère plus

élevées pour une même dose administrée. À l'inverse, l'hydroxylation de la débrisoquine par le CYP2D6 est augmentée chez les MR, alors que les MI auront une activité enzymatique normale (Frank et coll., 2007). Un autre exemple de polymorphisme est celui du CYP2C19. Les différences interindividuelles d'activité d'hydroxylation du CYP2C19 ont d'abord été caractérisées dans le métabolisme de la méphénytoïne (Kupfer et Preisig, 1984). Tout comme le CYP2D6, on distingue des MR, des MI et des ML. Cliniquement, cet isoforme est également très important puisqu'il est responsable de la biotransformation de plusieurs médicaments comme les anticonvulsivants, le diazépam, le naproxène et l'oméprazole (Katzung, 2004). Enfin, un autre membre de la sous-famille 2C, le CYP2C9, impliqué notamment dans le métabolisme de la phénytoïne, de la tolbutamine et des AINS, présente également un polymorphisme bien connu (Miners et Birkett, 1998).

2.6 Régulation des CYP

Les enzymes du cytochrome P450 sont étroitement régulés permettant ainsi une rapide adaptation aux besoins et aux conditions de l'hôte (Corcos et coll., 2002). Dû à leur importance tant pour le métabolisme et l'élimination de xénobiotiques que pour la biotransformation de molécules endogènes, une connaissance accrue des mécanismes de régulation de ces enzymes devient essentielle. L'induction enzymatique constitue une réponse adaptative rapide qui permet l'augmentation transitoire de la capacité cellulaire et tissulaire d'élimination des xénobiotiques. À l'inverse, l'inhibition enzymatique, en réduisant la vitesse d'élimination des médicaments, va augmenter leur demi-vie

biologique (Corcos et coll., 2002). Ces deux phénomènes sont souvent le résultat d'interactions médicamenteuses et la cause d'effets secondaires.

2.6.1 Induction des CYP

L'exposition du corps à des xénobiotiques entraîne parfois une augmentation de l'expression des CYP, une réponse adaptative de l'organisme qui tente d'accélérer leur métabolisme afin de mieux se débarrasser des molécules exogènes. Ce processus d'induction des CYP est hautement régulé et a lieu essentiellement au niveau transcriptionnel (Williams et coll., 2005). La régulation transcriptionnel de l'expression des CYP est réalisée par des récepteurs nucléaires. Dans les sections qui suivent, nous discuterons des récepteurs nucléaires et facteurs de transcription impliqués dans la régulation et l'induction transcriptionnelle des CYP.

2.6.1.1 Récepteur constitutif à l'androstane (CAR)

Le récepteur nucléaire CAR est hautement exprimé dans le foie et possède un mécanisme d'action particulier puisqu'il est constitutivement actif même sans ligand (Baes et coll., 1994). La liaison d'un ligand à CAR, comme l'androstane, provoquera la dissociation entre CAR et les promoteurs de ses gènes cibles et du même coup, l'inhibition de la transcription de ces gènes (Forman et coll., 1998). Par un mécanisme d'activation plus classique des récepteurs nucléaires, la liaison d'un certains nombres de ligands chimiques tels les xénobiotiques (le phénobarbital par exemple) induira à l'opposé la translocation nucléaire de CAR et permettra ainsi la transcription de gènes spécifiques comme les CYP (Kawamoto et coll., 1999). D'une certaine manière, le récepteur nucléaire CAR se comporte comme un récepteur nucléaire traditionnel des hormones stéroïdiennes, tel le

récepteur aux glucocorticoïdes (GR), puisqu'il est retenu à l'intérieur du cytoplasme jusqu'à l'exposition d'activateurs et non à l'intérieur du noyau comme la plupart des récepteurs nucléaires. Cependant, la nature constitutivement active de CAR, plus le fait que la plupart de ses activateurs ne se lient pas directement sur le récepteur, reflètent un mécanisme bien distinct (Swales et Negishi, 2004). CAR forme un complexe avec la protéine de choc thermique HSP90 (Heat shock protein 90) et est retenu dans le cytoplasme par la co-chaperonne CCRP (cytoplasmic CAR retention protein) (Koike et coll., 2007). Cette rétention dans le cytoplasme prévient une activation continue des gènes cibles de CAR et permet ainsi une régulation très précise de l'activité du récepteur (Swales et Negishi, 2004). En réponse à un inducteur, tel le phénobarbital (PB), le complexe CAR-HSP90 recrute la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui produit une déphosphorylation de CAR le libérant de HSP90 et permet ainsi sa translocation dans le noyau (Figure 7). Il a en effet été démontré que l'inhibiteur de la protéine phosphatase, l'acide okadaïque (OA), qui à de faibles concentrations nanomolaires inhibe préférentiellement la PP2A (Yoshinari et coll., 2003), bloque la translocation de CAR induite par le phénobarbital (Honkakoski et Negishi, 1998). À l'inverse de la PP2A, l'activation de la protéine kinase ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase), en phosphorylant CAR, empêche sa translocation dans le noyau (Koike et coll., 2007). Une fois à l'intérieur du noyau, CAR forme un hétérodimère avec le récepteur X du rétinoïde (RXR) pour ensuite se lier à des éléments de réponse aux xénobiotiques comme le PBREM (élément de réponse au phénobarbital), lequel régule un bon nombre de sous-familles de CYP tels que CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2H, CYP3A et CYP6A. CAR se lie au motif de type DR4 (répétitions directes séparées par 4 pb) à l'intérieur du PBREM

mais peut également se lier à DR3, DR5 et ER6 (élément de réponse 6) (Sueyoshi et Negishi, 2001).

Figure 7. Voie d'activation induite par le PB de la transcription de CYP par CAR.
(Modifiée de Zelko et Negishi, 2000)

2.6.1.2 Récepteur X Prégnane (PXR)

Une autre protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires associée à l'expression des CYP est le PXR. Identifié en 1998, le PXR est largement exprimé dans le foie mais également au niveau de l'intestin grêle, deux organes impliqués dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques (Ma et coll., 2008). L'activation de PXR est dite « ligand-dépendante » parce que suite à la liaison du ligand, le PXR forme un hétérodimère avec le RXR et se lie ensuite aux éléments de réponse du PXR pour activer la transcription des gènes cibles (Figure 8).

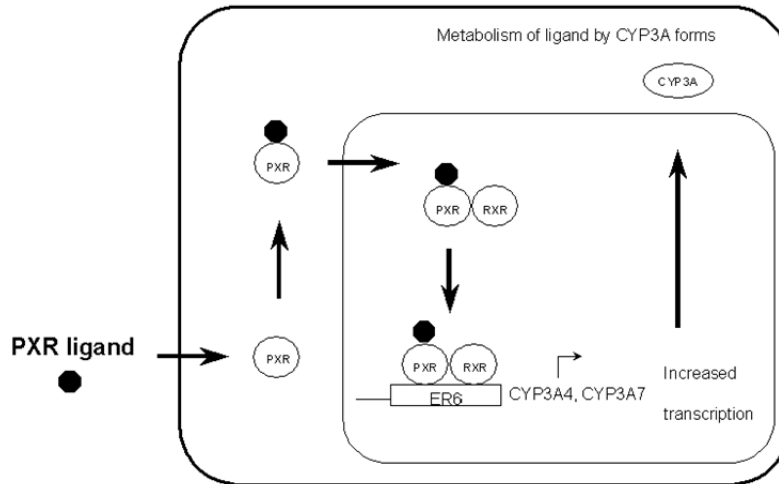


Figure 8. Voie d'activation de la transcription de CYP par PXR.
Source : <http://herkules oulu.fi/isbn9514258649/html/x579.html>

Les ligands physiologiques du PXR sont structurellement très variés et incluent des médicaments, des suppléments diététiques, des polluants de l'environnement, en plus de certaines molécules endogènes comme les acides biliaries (Carnahan et Redinbo, 2005). Parmi les médicaments capables de lier le PXR, on note la rifampicine, la dexaméthasone (Dexa), le taxol, le clotrimazole, le phénobarbital et la spironolactone (Kliwer et coll., 2002). Cette grande variété de ligands démontre l'habilité du récepteur à s'adapter à différentes grosseurs et structures de ligands (Watkins et coll., 2001). Tout comme CAR, PXR se lie aux sites DR3, DR4 et ER6 à l'intérieur des éléments de réponse aux xénobiotiques et est un activateur très important de la transcription du CYP3A4 (Corcos et coll., 2002). De plus, les deux CAR et PXR sont activés par des ligands communs (rifampicine et phénobarbital par exemple); l'activation du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) par la Dexa augmente l'expression de CAR et de PXR, ce qui a pour effet de potentialiser l'induction du CYP3A4 initiée par le PB (Williams et coll.,

2005). Puisque CAR et PXR semblent contrôler des fonctions communes, ceci suggère des interactions fonctionnelles (cross-talk) entre leurs voies de signalisation cellulaire (Pascussi et coll., 2000a).

2.6.1.3 Récepteurs aux Glucocorticoïdes (GR)

Les glucocorticoïdes constituent une classe d'hormone stéroïdienne très impliquée dans les fonctions immunologiques et métaboliques. Ces hormones exercent leurs nombreux effets en se liant aux GR. Ces récepteurs sont exprimés dans la plupart des cellules du corps et régulent la transcription de gènes cibles impliqués dans le développement, le métabolisme et la réponse immunitaire (Lu et coll., 2006). En absence de ligand, le GR se retrouve séquestré à l'intérieur du cytoplasme et forme un complexe avec plusieurs protéines dont les protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 (Pratt et coll., 2006). La liaison du ligand permet au récepteur GR de migrer dans le noyau où il s'homodimérise et se lie aux éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GREs) (Audet-Walsh et Anderson, 2009). Ce type de ligand stéroïdien, principalement la Dexaméthasone, participe à l'induction des CYP. Cependant, la plupart de ces inductions ne dépendent pas d'une interaction directe entre les GR et les gènes des CYP, mais dépendent plutôt d'une interaction avec d'autres récepteurs nucléaires actifs dans la régulation des CYP. Comme mentionné précédemment, la Dexaméthasone augmente l'expression de CAR et de PXR et potentialise l'induction du CYP3A4 induite par le PB (Williams et coll., 2005). Cette même Dexaméthasone potentialise également l'induction du CYP1A1 induite par le TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) (Celander et coll., 1997).

2.6.1.4 Les récepteurs activés des proliférateurs de peroxyosomes (PPAR)

Les PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) font partis d'un groupe de récepteurs nucléaires qui fonctionnent comme des facteurs de transcription en régulant l'expression de différents gènes impliqués entre autre dans la différenciation cellulaire et dans le métabolisme de lipides ou de protéines tel le CYP4A (Michalik et coll., 2006). Il existe trois isoformes de PPAR provenant de trois gènes différents, soit les PPAR α , PPAR γ et PPAR δ (Berger et Moller, 2002). Les PPAR α ont été les premiers découverts lors d'études cherchant à trouver des cibles moléculaires pour un groupe d'agents chimiques appelés « peroxisome proliferators ». Les PPAR α sont hautement exprimés au niveau du foie et des reins (coexprimés avec les CYP4A dans ces tissus) et jouent un rôle essentiel dans le catabolisme des acides gras saturés et polyinsaturés et dans l'inflammation (Williams et coll., 2005). Les PPAR γ se situent essentiellement dans les tissus adipeux. Une fois activés, ils modulent l'expression de gènes impliqués dans la β -oxydation des acides gras et dans l'insulino-résistance (Schoonjans et coll., 1996). Les PPAR δ se retrouvent dans l'intestin et dans le foie et sont des inhibiteurs potentiels des transcriptions induites par les PPAR α et PPAR γ (Xu et coll., 1999). Tout comme CAR et PXR, les PPAR activés forment un hétérodimère avec le RXR dans le noyau et se lient à des éléments de réponse spécifiques de leurs gènes cibles, les PPRE (peroxisome proliferator hormone response elements) (Williams et coll., 2005). Parmi les substrats exogènes des PPAR, on note les fibrates, comme le fénofibrate ou le gemfibrozil, qui sont utilisés pour réduire les concentrations des triglycérides et ainsi les VLDL; ces médicaments diminuent légèrement les LDL et augmentent les HDL. Les fibrates sont des agonistes des PPAR α (Chinetti-Gbaguidi et coll., 2005). On note également les

thiazolidinediones (glitazones), comme la rosiglitazone ou la pioglitazone, utilisées dans le traitement du diabète de type 2 et qui sont des agonistes des PPAR γ (Touyz et Schiffrin, 2006).

2.6.1.5 Facteur inductible par l'hypoxie 1 (HIF-1) et Protéine activatrice 1 (AP-1)

Les HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) sont des protéines agissant comme des facteurs de transcription qui contrôlent l'homéostasie cellulaire de l'oxygène en régulant les réponses physiologiques en état d'hypoxie (Berra et coll., 2001). Découvertes en 1992 par Semenza et ses collaborateurs alors qu'ils étudiaient le gène de l'hormone érythropoïétine (EPO), les HIF-1 sont des hétérodimères formés par une sous-unité α et une sous-unité β (Semenza et Wang, 1992). La sous-unité β est le facteur de translocation nucléaire (Arnt) des récepteurs des aryl-hydrocarbures (AhR) et est constitutivement active. En conditions normales d'oxygénation, la sous-unité α est une protéine très instable et rapidement dégradée par le protéasome (Semenza, 2000). L'hypoxie aura pour effet de stabiliser HIF-1 α lui permettant ainsi de former l'hétérodimère HIF-1 α/β et du même coup d'aller moduler la transcription de gènes cibles en se fixant aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE). De retour à des pressions normales d'oxygène, les protéines HIF-1 α se trouvant dans le noyau subiront aussitôt une ubiquitination et seront dégradées par les protéasomes nucléaires (Berra et coll., 2001).

Le facteur de transcription AP-1 (Activator protein 1) est également activé par l'hypoxie via une signalisation dépendante de la c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Fradette et du Souich, 2003). L'activation de JNK entrainera l'hétérodimérisation des protéines c-Fos et c-Jun pour former AP-1 qui ira ensuite lier l'ADN afin de moduler l'expression de gènes cibles (Gozal et coll., 1999). HIF-1 et AP-1 agissent en coopération pour induire la transcription de gènes. L'activation des deux facteurs de transcription implique les voies de signalisation des MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Salnikow et coll., 2002). HIF-1 et AP-1 font également partie des voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'induction du CYP3A6 produite par l'hypoxie (Fradette et du Souich, 2003).

2.6.2 Inhibition des CYP

L'inhibition des CYP peut se réaliser via un effet direct ou indirect sur l'enzyme ou par une diminution de l'expression de la protéine. Une inhibition directe de l'activité enzymatique peut avoir lieu en ciblant spécifiquement un ou plusieurs des quatre paliers du cycle catalytique des CYP : lors de la liaison du substrat au Fe^{3+} de l'hémoprotéine (étape 1), lors du transfert des électrons pour réduire le Fe^{3+} (étape 2), lors de la liaison de l'oxygène au Fe^{2+} (étape 3) et lors de l'oxydation du substrat (étapes 7 et 8). Les inhibiteurs qui interfèrent avec le cycle catalytique avant le processus d'oxydation sont de types réversibles (compétitifs ou non-compétitifs). Les inhibiteurs agissant pendant ou après le transfert de l'oxygène sont de types irréversibles ou quasi-irréversibles (Lin et Lu, 1998).

2.6.2.1 Inhibition réversible des CYP

Lors de l'étape 1 du cycle catalytique, un inhibiteur réversible compétitif peut entrer en compétition avec un autre substrat pour la liaison à la poche lipophile du site actif de l'enzyme. Pour ce type d'inhibition, on peut évoquer l'exemple du benzène qui inhibe le métabolisme hépatique du toluène et vice-versa (Sato et Nakajima, 1979). La liaison d'un substrat à l'atome de fer (Fe^{3+}) peut aussi rendre plus difficile la réduction du Fe^{3+} par l'électron provenant de la NPR et ainsi empêcher son oxydation. Les exemples du monoxyde d'azote (NO) et du cyanure correspondent à ce type d'inhibition (Minamiyama et coll., 1998). Un autre type d'inhibition réversible est la liaison d'un substrat au Fe^{2+} comme dans le cas du monoxyde de carbone (CO) (Dulak et Józkwicz, 2003). Dans ce cas-ci, la liaison du CO au Fe^{2+} entraîne un échange d'électron entre l'atome de carbone et le Fe^{2+} ce qui entrave la liaison avec l' O_2 . Enfin, un substrat peut se lier au Fe^{3+} et à la poche lipophile de l'enzyme. L'hydrophobicité et la force de la liaison à l'hème de ces substrats tels la métyrapone, la cimétidine ou le fluconazole produit une inhibition non compétitive très efficace (Testa et Jennifer, 1981).

2.6.2.2 Inhibition irréversible des CYP

Le métabolisme d'une substance peut mener à la formation d'intermédiaires réactifs (métabolites) qui peuvent inhiber l'enzyme de manière irréversible ou quasi-irréversible (Fontana et coll., 2005). Cet effet peut venir s'ajouter à l'inhibition réversible déjà provoquée par la liaison de la substance mère à l'enzyme. Dans certains cas, comme celui des dérivés thiocarbonylés, un agent peut entraîner la formation de radicaux qui viennent se fixer de façon covalente aux CYP et former des adduits (Miller et coll., 1983). Dans

d'autres cas, des intermédiaires formés par la biotransformation d'alkylamines ou d'amines aromatiques (comme l'antibiotique érythromycine par exemple) peuvent se fixer quasi-irréversiblement au Fe^{3+} de l'hème (Franklin, 1997). Enfin, d'autres métabolites peuvent également modifier en alkyle ou en aryle le groupe prosthétique de l'hème et même provoquer la dénaturation de la protéine en dégradant l'hème (Fernandez et coll., 1982).

2.6.2.3 Inhibition par diminution d'expression de la protéine

Finalement, l'inhibition des CYP peut être causée par une diminution d'expression de leur protéine. L'activation d'éléments de régulation négative, par le NF- κ B (Nuclear factor-kappa-B) impliqué dans l'inhibition du CYP2C11 induite par l'IL-1, peut en être la cause (Iber et coll., 2000). La diminution d'expression de la protéine peut aussi être la conséquence d'une diminution d'éléments amplificateurs. La protéine de liaison d'amplificateur/CAAT (C/EBP : CCATT /enhancer binding protein α) participant à la transcription de plusieurs gènes de CYP dont les CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A4, est diminuée par l'IL-2 (Tinel et coll., 1999). La diminution de récepteurs nucléaires ou de facteurs de transcription impliqués dans la régulation des CYP est une autre cause possible. L'exemple de la réduction de l'expression de l'ARNm de CAR et PXR provoquée par l'IL-6 démontre bien ce principe (Pascussi et coll., 2000a). Pour terminer, la réduction d'expression de la protéine peut être le résultat d'une inhibition post-transcriptionnelle soit par dégradation par le système ubiquitine-protéasome ou par l'intervention de microRNA (miRNA) qui bloque la traduction de l'ARNm ou compromet la stabilité de celui-ci (Ingelman-Sundberg et coll., 2007).

3. La NADPH P450 Réductase

Pour que les enzymes du cytochrome P450 (CYP) puissent accomplir leurs différentes fonctions dans l'organisme, elles nécessitent l'apport d'électrons provenant de la NADPH P450 réductase (voir cycle catalytique, section 2.4). Les sections qui suivent vont s'attarder à l'historique, à la description, aux fonctions ainsi qu'à la régulation de cette protéine.

3.1 Définition et historique de la NPR

La NADPH P450 réductase (NPR) est une flavoprotéine donatrice d'électrons. Elle fut d'abord isolée chez la levure dans les années 40 et considérée comme une protéine active à la réduction du cytochrome *c*, dépendante de la NADPH et contenant un groupe prosthétique FMN (Flavin mononucleotide) (Haas et coll., 1940). L'équivalent chez les mammifères fut isolé en 1950 par le même groupe de Horecker dans le foie de cochon. On rapporta alors la présence du cofacteur de réduction FAD (flavin adenine dinucleotide) (Horecker, 1950). D'autres études ont par la suite démontré que la NPR était située majoritairement dans le foie, au niveau du réticulum endoplasmique, et qu'elle participait au transport des électrons dans les microsomes (Williams et Kamin, 1962). À ce moment, on croyait encore que les deux cofacteurs de l'enzyme (la FAD et la FMN) intervenaient dans la réduction du cytochrome *c* (Phillips et Langdon, 1962). La protéine initialement isolée était en effet incapable de transférer ses électrons aux protéines microsomaux cytochrome *b₅* et CYP. La présence de trypsine dans la méthode de purification utilisée à l'époque occasionnait la perte du groupement NH₂ terminal, essentiel à la liaison de la NPR aux CYP et aux membranes, ce qui empêchait le transfert

d'électrons (Black et coll., 1979). Le véritable partenaire d'oxydoréduction de la NPR, le cytochrome P450, ne fut découvert que plus tard, en 1968, par le groupe de Lu et Coon (Lu et Coon, 1968). Ces derniers réussirent à isoler la forme intacte de la protéine (70-80 kDa) grâce à des procédures de solubilisation des microsomes du foie par des détergents et conclurent alors que la NPR est essentielle à la réduction du groupement hème des CYP (Yasukochi et Masters, 1976). La NPR fait partie de la famille des diflavines réductases qui sont apparues suite à la fusion entre deux protéines ancestrales : la FMN et la FAD. Chez les mammifères, cette famille inclut quatre enzymes: la NPR, la méthionine synthase réductase, la NR1 (Novel reductase 1) et l'oxyde nitrique synthétase (Paine et coll., 2005).

3.2 Structure de la NPR

La NPR est une protéine ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique. En lien avec ses fonctions très variées dans la cellule, elle est hautement exprimée dans la plupart des tissus mais de manière plus abondante dans le foie, tout comme les CYP (Paine et coll., 2005). Chaque NPR est constituée de deux cofacteurs diflavines (FAD et FMN) en proportions égales (Iyanagi et Mason, 1973). La figure 9a) montre l'arrangement tridimensionnel de la protéine. On peut observer en bleu le domaine de liaison du FMN, en rose le domaine de connexion et en vert le domaine de liaison du FAD et du NADPH. Les cofacteurs sont représentés au centre de la structure. En bleu pâle on note le FMN, en jaune le FAD et en rouge le NADP⁺. La figure 9b) correspond au diagramme topographique de la NPR et nous montre l'arrangement des hélices alpha et des feuilletts

bêta de la molécule. Finalement, au bas de la figure se trouve un diagramme linéaire démontrant l'alignement des différents domaines de liaison.

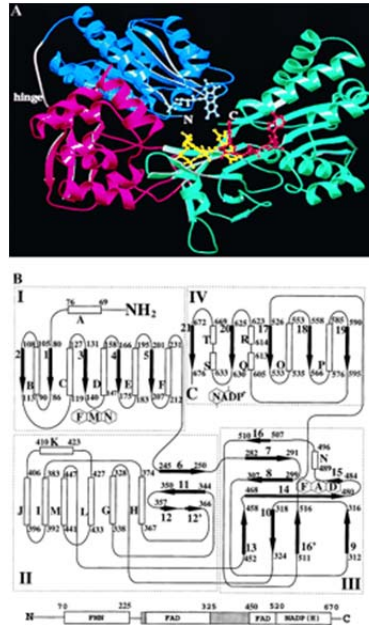


Figure 9. Structure secondaire et tertiaire de la NPR (Wang et coll., 1997).

3.3 Rôles de la NPR

La fonction principale de la NPR est le transfert d'électrons aux CYP pour assurer leur fonctionnement. Le rôle des deux cofacteurs flavines dans ce mouvement d'électrons a été élucidé par le groupe de Coon qui démontra que la FAD agissait comme accepteur d'électrons alors que la FMN et la NADPH comme donneurs d'électrons pour des protéines telles les CYP (Figure 10) (Vermilion et coll., 1981).



Figure 10. Transfert d'électrons de la NPR aux CYP.

Source : http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm

Ce transfert d'électrons nécessite la formation d'un complexe NPR/CYP (Figure 11). L'interaction entre ces deux protéines est basée principalement sur l'appariement de charges électrostatiques (Inano et Tamaoki, 1985). Les CYP forment un dipôle électrostatique à travers la molécule, avec des charges positives sur la face proximale de la protéine tout près du groupement de l'hème. La NPR contient quant à elle plusieurs groupes carboxylates chargés négativement à sa surface dû à la présence d'acides aminés tels que l'aspartate et le glutamate. L'appariement de ces charges électrostatiques opposées permet la connexion et l'orientation du pairage. Les forces hydrophobiques entre les deux molécules provenant d'acides aminés non-polaires (leucine, valine, etc.) permettent d'atteindre une proximité adéquate au transfert d'électrons (Nadler et Strobel, 1991).

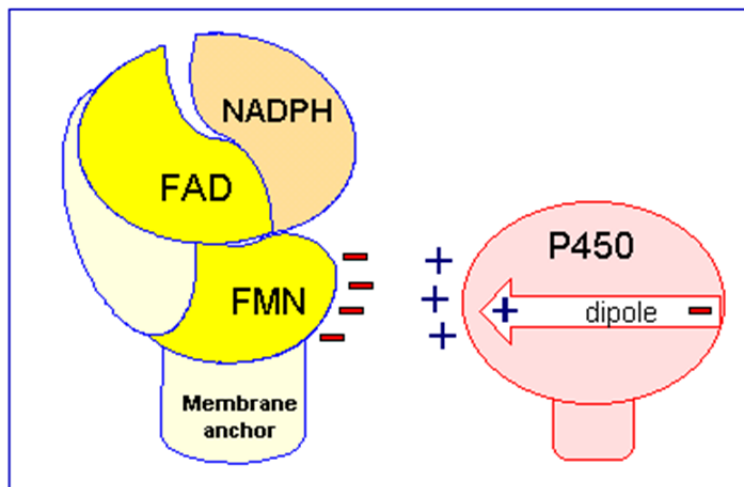


Figure 11. Interaction NPR/CYP.

Source : http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm

La NPR permet l'apport d'électrons à deux étapes spécifiques du cycle catalytique des CYP (Figure 2). Un premier électron sert à réduire le fer de l'état ferrique (Fe^{3+}) à l'état ferreux (Fe^{2+}). Cette réduction de l'atome de fer des CYP permet de fixer l'oxygène et est

essentielle à l'activité catalytique de l'enzyme. Le deuxième électron est transféré au cytochrome b_5 et sert à activer l'oxygène en superoxyde (O_2^-).

En plus de participer à la réduction des CYP, la NPR est aussi impliquée dans des réactions de nitroréduction et dans des mécanismes incluant l'action du cytochrome b_5 pour la désaturation des phospholipides ou l'élongation des acides gras (Backes, 1993).

3.4 Régulation de la NPR

Contrairement aux CYP, la NPR, tout comme le cytochrome b_5 , possède une longue demi-vie biologique qui peut s'étendre sur plusieurs jours (Correia, 1991). De plus, la NPR n'est induite que très faiblement par des inducteurs typiques des CYP, tels le phénobarbital ou la prégnénolone (Gonzalez et Kasper, 1980). Au niveau transcriptionnel, l'expression de la NPR est régulée par l'axe hypophyso-thyroïdien. L'hormone thyroïdienne T3 (triiodothyronine) est nécessaire au maintien de son expression. Une hypophysectomie, l'ablation chirurgicale de la glande hypophyse, entraîne une diminution d'expression de la T3 et provoque du même coup une réduction de plus de la moitié des niveaux de NPR dans le foie (Li et coll., 2001). En plus de cette régulation pré-transcriptionnelle, la T3 régule également l'expression de la NPR via une stabilisation de son ARNm (O'Leary et coll., 1997).

Puisque l'activité catalytique des CYP dépend de la NPR, une perturbation de ces flavoprotéines mènera nécessairement à des conséquences importantes au fonctionnement cellulaire. L'abolition du gène de la NPR dans la souris est létale pendant l'embryogénèse (Shen et coll., 2002). Ceci est possiblement dû à l'absence de transport d'électrons aux CYP extra-hépatiques puisque des souris knock-out spécifiques pour le gène de la NPR

du foie présentent un métabolisme hépatique considérablement diminué mais demeurent viables (Gu et coll., 2003). Il existe également certains polymorphismes génétiques pour le gène de la NPR et chacun est associé à un désordre physiologique (Huang et coll., 2005). Par exemple, 5 mutations nonsense ont été identifiées dans le gène de la NPR chez des patients atteints du syndrome Antley-Bixler, un désordre congénital caractérisé par des malformations du squelette (Fluck et coll., 2004).

En résumé, la NPR représente un élément extrêmement important pour l'activité d'un groupe d'enzyme crucial au métabolisme de multiples substances endogènes et des xénobiotiques, et son dysfonctionnement peut entraîner des conséquences tragiques pour l'organisme. En dépit de l'importance de la NPR, jusqu'à présent, très peu d'études se sont intéressées à la régulation de la NPR.

4. Inflammation

4.1 Définition

L'inflammation est une réaction de défense immunitaire en réponse à une agression exogène, telle l'infection d'un pathogène, ou endogène, telle une réaction d'hypersensibilité ou simplement suite à un traumatisme. L'inflammation constitue une composante importante de la défense immunitaire de l'organisme. En général, la réaction inflammatoire (RI) est une réponse adaptée et est contrôlée par de nombreux systèmes régulateurs qui jouent un rôle protecteur en participant aux processus de défense naturelle en plus d'être impliqués dans la réparation des tissus lésés. Sans cette réaction de défense, la guérison ne pourrait être complétée et la destruction progressive des tissus

compromettrait la survie cellulaire. Dans d'autres cas, cette réponse est incontrôlée (inadaptée) et peut devenir dommageable pour l'organisme. On divise les réactions inflammatoires en réponses locales et en réponses systémiques.

La réponse locale se caractérise par cinq signes cardinaux cliniques : la rougeur, la chaleur, la tumeur (œdème), la douleur et la perte de fonction (Plytycz et Seljelid, 2003). Les quatre premiers signes cardinaux ont été décrits par Aulus Cornelius Celsus, un encyclopédiste romain reconnu pour ses travaux médicaux. Le cinquième signe, la perte de fonction, fut rajouté plus tard par Aelius Galen, un médecin romain d'origine grecque (Porth, 2007). La rougeur et la chaleur sont dues à l'augmentation de la circulation sanguine au site d'inflammation avec dilatation des artérioles, des capillaires et des veinules. Cette vasodilatation a pour but d'accentuer la circulation du sang afin d'évacuer les cellules mortes et les toxines, et d'apporter les éléments nécessaires à la guérison pour combattre l'agression. La tumeur (œdème) provient de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la douleur des substances libérées qui stimulent les terminaisons nerveuses. La perte de fonction, quant à elle, est due à plusieurs causes, telles la douleur et la tumeur (Arakrama et Clive, 2005). Cette réponse locale peut être aiguë ou chronique. La phase aiguë est la réponse initiale du corps et cesse dès que le stimulus disparaît. La phase chronique peut durer des semaines, même des années. Elle fait intervenir des composantes cellulaires différentes de la phase aiguë et peut mener à la destruction des tissus (Laroux, 2004).

La réponse systémique (exemple un choc septique) peut se produire lorsqu'un agent infectieux ou ses toxines sortent du site inflammatoire des tissus par la circulation sanguine ou lymphatique et se dispersent dans tout l'organisme. On observe alors des

signes cliniques plus sévères tels de la fièvre importante, de l'hypotension, de l'insuffisance cardio-circulatoire, de l'insuffisance rénale, pour potentiellement aboutir à une insuffisance de multiples organes et la mort (Sriskandan et Altmann, 2008). Cette réponse systémique affecte la synthèse de protéines plasmatiques mais également les systèmes endocrinien et hématologique. La réponse inflammatoire est composée de trois séquences d'évènements complexes et intriqués. Tout d'abord, une phase d'initiation suite au signal de danger provoqué par l'agression exogène ou endogène qui enclenche des effecteurs primaires. Puis, une phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation des effecteurs secondaires. Finalement, une phase de résolution ou de réparation qui rétablit l'intégrité du tissu lésé.

4.2 Composantes cellulaires de l'inflammation

Les composantes cellulaires de l'inflammation sont principalement des leucocytes, comme les macrophages et les neutrophiles, qui migrent au tissu avec la réaction inflammatoire et libèrent des cytokines, des protéines de phase aiguë ainsi que des hormones (Renton, 2001). Cette phase cellulaire comporte trois étapes : la margination des leucocytes sur les parois endothéliales, l'interaction des leucocytes avec les parois via les sélectines, l'adhésion cellulaire via les intégrines et les molécules d'adhésions, et enfin la diapédèse, soit le passage des leucocytes à travers la paroi endothéliale (Opdenakker, 2001). Tous les leucocytes proviennent de cellules multipotentes hématopoïétiques produites dans la moelle osseuse.

Parmi les principaux types de leucocytes impliqués dans l'inflammation, on dénote tout d'abord les neutrophiles qui appartiennent à la classe des granulocytes. Ils représentent à

eux seuls environ 65 % de l'ensemble des leucocytes du sang et jouent un rôle essentiel dans la phagocytose de cellules étrangères ou infectées (Furze et Rankin, 2008). Étant très mobiles, les neutrophiles sont attirés par des cytokines exprimées par l'endothélium activé et sont les premières cellules à converger au point d'infection. Les neutrophiles expriment et relâchent à leur tour d'autres cytokines ce qui amplifie la RI. Les neutrophiles matures font partie de la réserve cellulaire pendant environ 5 jours; ils sont par la suite relâchés dans le sang, où ils circulent pendant environ 10 heures. Une fois activés, ils migrent jusqu'au tissu lésé et meurent après seulement une ou deux journées (Bainton, 1999).

Une autre composante cellulaire participant au processus inflammatoire est le macrophage provenant de la différenciation des monocytes. Tout comme les neutrophiles, les macrophages phagocytent des débris cellulaires et des pathogènes en plus d'être capables de se comporter comme des cellules présentatrices d'antigènes (Fujiwara et Kobayashi, 2005). Les macrophages participent aussi à l'immunomodulation en produisant différentes cytokines, chimiokines et facteurs de croissances et en activant l'endothélium pour favoriser la mobilisation des neutrophiles (Fujiwara et Kobayashi, 2005). Les principales cytokines effectrices lors de la RI sont l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α et l'IFN- γ (Goldsby et coll., 2001).

Un autre leucocyte granulaire jouant un rôle important dans l'inflammation est l'éosinophile. Une fois activés, les éosinophiles migrent immédiatement vers un stimulus attractif grâce à leur propriété de chimiotaxie et défendent l'organisme en s'attaquant aux parasites, sans les phagocyter. Ils se fixent aux corps étrangers et déversent leurs granules qui contiennent des enzymes destinées à les détruire (Hogan et coll., 2008). Les

thrombocytes sont aussi engagés dans l'inflammation en sécrétant des substances chimiotactiques qui facilitent l'attachement des leucocytes à l'endothélium, favorisant ainsi leur diapédèse (Jurk et Kehrel, 2005). Finalement, les basophiles, bien que très rare, et les mastocytes synthétisent et emmagasinent de nombreuses molécules chimiques essentielles à l'inflammation dont l'histamine, des cytokines (l'IL-1, l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, le GM-SCF et l'INF γ) et des protéases (Mitre et Nutman, 2006).

4.3 Impact de l'inflammation sur les CYP

La RI peut être septique, c'est-à-dire provoquée par un agent infectieux, comme lors d'une pneumonie bactérienne, ou aseptique, c'est-à-dire exempte d'agent infectieux comme un cancer, le psoriasis ou l'inflammation produites par des substances chimiques, telle la térébenthine. Dans les deux cas, l'inflammation aura pour effet d'accentuer la synthèse et la relâche de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires en plus de divers enzymes (Dumais et coll., 2008). Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle crucial dans la diminution de l'expression des CYP ainsi que des transporteurs membranaires des xénobiotiques. Les premières constatations cliniques de l'impact d'une RI sur le métabolisme des xénobiotiques, et donc par le fait même sur l'expression des CYP, furent l'apparition d'effets indésirables associés à un médicament chez des patients avec un processus inflammatoire. En 1975, Zwillich et ses collaborateurs observèrent que huit de leurs patients avaient présenté des convulsions suite à un traitement à la théophylline et que ces mêmes patients étaient tous déjà atteints de maladies pulmonaires et cardiovasculaires sévères (Zwillich et coll., 1975). Peu après, on démontra que chez des patients souffrants d'une pneumonie, les concentrations plasmatiques de théophylline

étaient plus élevées suite à une diminution de la clairance (Powell et coll., 1978). De plus, pour les patients avec une RI aiguë, la clairance de la théophylline revenait à des valeurs normales suite à la résolution de la pneumonie (Vozeh et coll., 1978). Ce même phénomène avec la théophylline fut également décrit chez des patients présentant une infection des voies respiratoires supérieures (IVRS) virales (Chang et coll., 1978). La clairance de la théophylline dépend de la déméthylation catalysée par le CYP1A2 (Zhang et Kaminsky, 1995). On démontra également que la clairance de l'antipyrine, dont le métabolisme dépend de l'activité enzymatique de plusieurs CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, et CYP3A), était diminuée chez des patients présentant une grippe (Laybourn et coll., 1986), une pneumonie (Sonne et coll., 1985) ou simplement de la fièvre (Elin et coll., 1975). Ceci suggère que le processus inflammatoire engendré par l'infection pulmonaire diminue l'expression des CYP. En résumé, tous ces rapports cliniques nous démontrent que l'expression et l'activité des CYP sont modulées par la RI et que cette inhibition peut affecter l'absorption, la distribution et l'élimination des xénobiotiques, phénomènes qui peuvent avoir des répercussions cliniques importantes.

Les mécanismes sous-jacents à ces modifications de biotransformation des xénobiotiques lors d'une RI sont très nombreux et complexes. La réponse du foie à l'inflammation se traduit généralement par l'augmentation des protéines de phase aiguë (PPA), comme par exemple, la protéine C-réactive (PCR). La phase aiguë de la RI est initiée par la libération de TNF- α et d'IL-1 par les mastocytes et les macrophages. Le TNF- α et l'IL-1 stimulent ensuite la libération d'IL-1 et d'IL-6 par les cellules endothéliales et les fibroblastes (Baumann et Gauldie, 1994). Ces médiateurs sériques produits lors du processus

inflammatoire sont responsables de la diminution de l'expression des CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2 et CYP3A2 chez le rat (Prandota, 2005).

L'administration sous-cutanée de térébenthine au lapin produit une RI aseptique qui diminue l'activité des CYP1A2 et CYP3A6 très précocement par une inhibition directe de l'enzyme et plus tardivement, par une diminution de l'expression de ces enzymes. Les médiateurs sériques libérés dans le sang entraînent la diminution d'expression des CYP (El-Kadi et coll., 1997). Le médiateur sérique dans le sérum de lapin impliqué dans l'inhibition précoce de l'activité est l'IL-6 (Bleau et coll., 2000). D'un autre côté, l'expression et la quantité d'ARNm des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 sont diminuées par cette RI. Suite à l'incubation pendant 48 heures d'hépatocytes de lapin avec du sérum provenant d'humains porteurs d'une infection virale ou de lapin avec une réaction inflammatoire produite par la térébenthine, il a été possible d'identifier les médiateurs sériques. Chez l'humain avec une infection virale, l'INF- γ est le principal responsable de la diminution de l'expression des CYP3A6 et CYP1A2, alors que chez le lapin, surtout l'IL-6 et marginalement l'IL1- β ont été identifiés comme responsables de la diminution de l'expression des CYP3A6 et CYP1A2 (Bleau et coll., 2003). Les voies de signalisation activées par les médiateurs sériques conduisant à la régulation négative des CYP n'ont cependant pas encore été clairement caractérisées. Certaines protéines kinases semblent jouer un rôle dans la modulation de l'expression des CYP. Parmi celles-ci, on note la protéine kinase C (PKC), la kinase de régulation extracellulaire (Erk), la protéine kinase activée par les mitogènes p38 (p38MAPK), la phosphatidylinositide 3-kinase (PI₃K) et la Janus kinase (JAK).

Par ailleurs, la RI affecte également l'expression de récepteurs nucléaires participant à la modulation des CYP. Lorsqu'incubé avec des hépatocytes humains, les médiateurs sériques IL-6 et TNF- α diminuent l'expression de l'ARNm de PXR et de RXR (Pascussi et coll., 2000b). Chez les rongeurs, le LPS (lipopolysaccharide) des bactéries induit d'abord une diminution rapide des niveaux d'ARNm de CAR, PXR et RXR (Beigneux et coll., 2002), puis une diminution plus tardive des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR) (Beigneux et coll., 2003).

4.4 Impact de la réaction inflammatoire sur la NPR

La cause de l'inhibition précoce de l'activité et de la diminution de l'expression tardive des CYP1A2 et CYP3A6 (Bleau et coll., 2000) n'est pas encore complètement caractérisée. Concernant l'inhibition précoce de l'activité, il est possible d'émettre l'hypothèse que la RI puisse inhiber la NPR et en conséquence, entraîner une diminution de l'apport des électrons du cycle catalytique des CYP. Actuellement, l'effet d'une RI et des cytokines pro-inflammatoires sur l'expression et l'activité de la NPR demeure très mal caractérisé. Des études ont démontré que l'injection de LPS chez des rats entraîne une diminution d'expression et d'activité de la NPR et du cytochrome b_5 (Morgan, 1989). Ces mêmes auteurs n'ont toutefois pas pu démontrer une diminution d'expression et d'activité de la NPR et du cytochrome b_5 en présence d'une RI induite par l'injection de térébenthine. D'autres études ont confirmé que l'injection de LPS diminuait l'activité de la NPR chez des poulets (Takahashi et coll., 1997). Cette diminution en contenu de la NPR suite à l'injection de LPS est prévenue par la N-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME, un inhibiteur de la NO synthase), mais n'est pas affectée par la mélatonine

(Sewerynek et coll., 1995). De plus, comme mentionné précédemment, le LPS induit une diminution des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR), un récepteur nucléaire étroitement impliqué dans la régulation transcriptionnelle de la NPR (Beigneux et coll., 2003).

Cette révision nous permet de conclure que la NPR est un système enzymatique vital à notre organisme et que les facteurs qui modulent son expression et activité sont mal caractérisés. De plus, le fait qu'une réaction inflammatoire diminue l'activité et l'expression de nombreuses protéines, dont des isoformes du cytochrome P450, soulève l'hypothèse que la réaction inflammatoire puisse affecter l'expression et l'activité de la NPR.

Le but de notre projet de recherche est de mieux caractériser les facteurs physiologiques qui modulent l'expression de la NPR, ainsi que d'étudier l'effet de la réaction inflammatoire sur l'activité et l'expression de la NPR. L'hypothèse du projet est que les cytochromes P450 et la NADPH P450 réductase doivent être régulés par des mécanismes communs.

B. Matériels et Méthodes

1. Isolement des hépatocytes

Des lapins mâles de race New-Zealand avec un poids corporel entre 2,2 et 2,5 kg, provenant de la ferme Charles-Rivers (Saint-Constant, Québec), sont maintenus dans des cages séparées et nourris avec de la nourriture de Charles-Rivers avec accès à de l'eau *ad libitum*. Pour permettre leur acclimatation au nouvel environnement, les lapins sont gardés dans leur cage pendant sept jours avant l'expérimentation. La réaction inflammatoire est induite par l'injection sous-cutanée de 2,5 ml de térébenthine de chaque côté du dos (5 ml). Quarante-huit heures après cette injection de térébenthine, les lapins présentent une réaction inflammatoire aseptique aiguë définie par une augmentation de la température rectale ($41,4 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$, comparé à $38,6 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ chez les lapins témoins ($p < 0,001$)), une discrète adynamie, une diminution de l'appétit et une perte de poids corporel.

Les lapins sont mis à jeun vingt-quatre heures avant le sacrifice. Le jour de la chirurgie, on prélève dans un premier temps 30 ml de sang de l'artère centrale de l'oreille du lapin pour quantifier les marqueurs de l'inflammation dans le sérum. Le lapin est ensuite sacrifié et les hépatocytes sont isolés selon la méthode de Seglen de perfusion du foie en deux étapes (Seglen, 1976) avec quelques modifications mineures (El-Kadi et coll., 1997). Cette méthode de perfusion du foie débute par l'anesthésie du lapin avec 30 ml/kg de penthiobarbital, un puissant barbiturique de courte durée. Suite à l'anesthésie, on procède à une laparotomie, c'est-à-dire à l'ouverture de l'abdomen par une incision large, afin de cathétériser la veine porte hépatique et la veine cave inférieure. De plus, la veine cave supérieure et l'aorte sont ligaturées afin de diriger le liquide de perfusion hépatique

vers la canule dans la veine cave inférieure. Le foie est par la suite perfusé en deux étapes. En premier lieu, pour éliminer le sang du foie, on fait circuler 800 ml d'une solution de lavage contenant 115 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de KH_2PO_4 , 25 mM de HEPES, 0,5 mM d'EGTA, 5,5 mM de glucose et 0,067 mg/ml d'héparine. Puis, on perfuse le foie avec une solution de collagénase 0,013% permettant la digestion des membranes intercellulaires. Cette solution de collagénase contient en plus 115 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de KH_2PO_4 , 25 mM de HEPES, 5,5 mM de glucose, 0,067 ug/ml d'héparine, 1 mM de CaCl_2 et 0,025 mM d'inhibiteur de trypsine. Ces perfusions sont effectuées via le cathéter inséré dans la veine porte hépatique à l'aide d'une pompe péristaltique. Les deux solutions sont préalablement barbotées à 37°C avec de l'oxygène pendant 30 minutes avant de les faire circuler dans les cathéters et seront maintenues à 37°C avec un barbotage constant tout au long de la procédure afin de saturer l'oxygène à 95 %. Lorsque la digestion des membranes intra hépatiques est complétée, c'est-à-dire lorsque le liquide perfusé parvient à diffuser à travers la membrane externe du foie, les hépatocytes sont séparés en peignant le foie avec un peigne de plastique. Le mélange obtenu est d'abord filtré une première fois à travers une membrane en nylon d'un diamètre de 230 μm , puis une seconde fois à travers un filtre en nylon de 80 μm . La suspension d'hépatocytes filtrée est ensuite divisée dans quatre tubes en quantité égale. Chaque tube est complété avec un volume égal de milieu de culture Williams Medium E (WME) auquel est rajouté 10% de sérum de veau, 1% de streptomycine/pénicilline ainsi que 1 μM d'insuline. Ces tubes sont centrifugés à 340 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant formé est aspiré, le culot suspendu de nouveau dans du milieu de culture et le tout est centrifugé à 340 rpm pendant 5 minutes. Ce même processus est répété une

deuxième fois. Suite aux trois centrifugations, les hépatocytes morts sont séparés des vivants grâce à une centrifugation dans un gradient de densité de percoll à 3850 rpm pendant vingt minutes. Ceci permet d'obtenir une viabilité supérieure à 90 % pour les hépatocytes mis en culture, viabilité confirmée par la coloration des cellules mortes au bleu de trypan (Delloye-Bourgeois et coll., 2009).

La mise en culture s'effectue en diluant les hépatocytes dans du WME afin d'obtenir 10^6 cellules/ml. La solution finale d'hépatocytes est par la suite déposée dans les puits de plaques antérieurement traitées au collagène. Pour les plaques de 6 puits dans lesquels on mesure l'expression des CYP et de la NPR, une concentration de 3×10^6 cellules est déposée dans chaque puits. Pour les plaques de 12 puits utilisées pour mesurer l'ARNm, on y dépose 10^6 cellules et finalement, pour les plaques de 24 puits qui servent aux mesures d'activité enzymatique, on y dépose $0,5 \times 10^6$ cellules. Une fois les hépatocytes sont mis en culture, on les incube pendant une heure à 37°C pour permettre l'adhérence des cellules à la matrice de collagène au fond des puits. Enfin, le milieu de culture est changé pour se débarrasser des cellules mortes et on incube de nouveau les hépatocytes pour la période de temps voulu à 37°C en présence des différents modulateurs des systèmes enzymatiques à caractériser.

2. Mesure de l'activité de la NPR

La mesure de l'activité enzymatique de la NPR s'effectue à la température de la pièce dans un tampon phosphate de Sorensen à pH 7.8 à partir de l'homogénat cellulaire recueilli dans les plaques à 6 puits. L'essai enzymatique mesure la capacité des cellules à réduire le cytochrome *c* oxydase en cytochrome *c* réductase, en présence du cofacteur

NADPH. Cette transformation du cytochrome *c* est faite par les NPR se trouvant dans les hépatocytes et va émettre une bande avec une absorbance à 550 nm mesurée par colorimétrie. On peut finalement obtenir la quantité d'unités de cytochrome *c* réduites par minute par millilitre contenue dans nos échantillons grâce au calcul suivant :

$$\frac{(\text{Absorbance/min} - \text{Absorbance à 0 min}) \times 1.1}{21.1 \times \text{Volume de l'échantillon}}$$

L'activité est mesurée après une minute de réaction; 21.1 est le coefficient d'extinction pour le cytochrome *c* réduit. Une unité catalyse la réduction de 1 μM de cytochrome *c* par minute (Masters et coll., 1967). L'activité est finalement corrigée par les mg de protéines dans les puits.

3. Mesure de l'activité du CYP3A6

L'activité enzymatique du CYP3A6 est mesurée dans les cellules des plaques à 24 puits recouvert de collagène. Le surnageant est d'abord aspiré, puis les cellules sont rincées à deux reprises avec 300 μL d'une solution de Krebs qui fut préalablement incubée à 37°C. Suite aux rinçages, on incube les cellules à 37°C pendant 20 minutes avec 300 μL d'une solution de Krebs contenant 60 μM de la sonde DFB (3,4-difluorobenzoyloxy-5,5-diméthyl-4-(4-méthylsulfonyl phényl)-(5*H*)-furan-2-one), un substrat non fluorescent du CYP3A4 (Chauret et coll., 1999). Cette sonde est diluée dans de l'acétonitrile et est conservée à 4°C dans une solution à 10 mM. Pendant l'incubation avec les hépatocytes, le DFB est métabolisé par le CYP3A6 en DFH (3-hydroxy-4-(4-méthylsulfonyl phényl)-(5*H*)-furan-2-one), un métabolite fluorescent. Une fois l'incubation terminée, on transfère 100 μL de surnageant dans une plaque à 96 puits au fond opaque contenant déjà 100 μL

d'un tampon Tris/Acétonitrile (0,05 M/ 40%). La fluorescence émise par le DFH est finalement quantifiée par fluorométrie (excitation à 360 nm et émission à 440 nm) à l'aide d'un lecteur de fluorescence pour microplaques (Victor2, 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer Wallac, Gaithersburg, MD).

4. Mesure d'expression de la NPR et du CYP3A6

L'expression protéique de la NPR ainsi que du CYP3A6 sont mesurées par immunobuvardage de type western (Western blot). Suite à l'incubation des hépatocytes dans des plaques à 6 puits pour la période de temps voulue (2, 4, 24 ou 48 heures), on aspire le surnageant et les hépatocytes sont aussitôt congelés par immersion dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. On utilise la technique de l'acide bicinchoninique (BCA assay) afin de quantifier la quantité de protéine totale de chaque échantillon. Les protéines sont diluées dans du tampon Laemmli afin de pouvoir déposer une quantité fixe pour sa séparation par électrophorèse sur un gel de sodium dodécyl sulfate/polyacrylamide (7,5%) (SDS-PAGE). Pour quantifier la NPR et le CYP3A6, nous utilisons 30 et 60 µg de protéines, respectivement. Une fois la migration sur gel complétée, les protéines sont transférées pendant 90 minutes sur une membrane de nitrocellulose grâce au système de transfert électrophorétique (Mini-trans-blot electrophoretic transfer system, Biorad, Hercules, CA, USA). Dû aux propriétés de liaison non-spécifique de la membrane, le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps est réalisé en immergeant la membrane dans du lait sans matière grasse en présence du détergeant Tween (tampon de blocage) pendant une heure à température ambiante (Towbin et coll., 1979).

Pour la détection et l'identification de la NPR, un anticorps monoclonal primaire anti-NADPH P450 réductase d'humain produit par la souris (à une dilution de 1:5000 dans du tampon de blocage) est incubé toute la nuit à 4°C avec la membrane de nitrocellulose. On lave ensuite la membrane avec du tampon phosphate salin (PBS) afin d'enlever les anticorps primaires non liés. Puis, on détecte les protéines en incubant pendant une heure la membrane avec un anticorps secondaire (IgG) anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort (à une dilution de 1:2000 dans du tampon de blocage). Cet anticorps lie l'anticorps primaire et le produit de la réaction émet une luminescence proportionnelle à la concentration en protéine. On place finalement la membrane contre un film photographique sensible qui, sous l'exposition de la lumière due à la réaction, crée une image des anticorps liés à la bande qui est mesurée par autoradiographie.

Pour ce qui est de l'isoforme CYP3A6, les mêmes étapes de détection et d'identification des protéines sont appliquées mais cette fois-ci en utilisant un anticorps primaire monoclonal anti-CYP3A1 de rat produit par la souris (à une dilution de 1 :250 dans du tampon de blocage) qui lie également le CYP3A6. L'anticorps secondaire est le même que celui utilisé pour la détection de la NPR et la luminescence ainsi formée est également visualisée par autoradiographie.

L'intensité de chaque bande obtenue sur le film photographique est mesurée par densitométrie avec le logiciel Un-Scan-It-Gel (Silk Scientific Inc., Orem, UT, USA) (Fradette et du Souich, 2003).

5. Isolement de l'ARN messager dans les hépatocytes

L'isolement de l'ARN messager (ARNm) dans les hépatocytes est effectué en utilisant le RNeasy Mini Kit de Qiagen. Suite à l'incubation des hépatocytes dans des plaques à 12 puits, le surnageant est aspiré et les hépatocytes sont rincés avec 500 μ L de PBS 1X. On ajoute ensuite 500 μ L de trypsine-EDTA 0,25% afin de permettre le détachement des cellules du fond des puits. Le mélange obtenu est déposé dans du milieu de culture pour désactiver l'action de la trypsine et le tout est centrifugé à 1200 g pendant 5 minutes. On se débarrasse du surnageant formé et le culot est conservé à -80°C jusqu'à l'extraction nucléaire. Celle-ci débute par la lyse des cellules en les faisant rapidement passer à travers une aiguille de 0,9 mm de diamètre et en ajoutant du β -mercaptoéthanol pour permettre la dénaturation des protéines (Nelson et coll., 2005). On ajoute 350 μ L d'éthanol 40 % au lysat et le tout est déposé sur une colonne RNeasy. Suite à une centrifugation de 30 secondes à 130 000 rpm, le surnageant est décanté et 350 μ L de solution RW1 est déposé sur la colonne. On centrifuge 30 secondes à 130 000 rpm et le surnageant est de nouveau décanté. On incube chaque échantillon avec de la DNase diluée dans du tampon RDD pendant 15 minutes puis on rince encore une fois la colonne avec du tampon RW1. On centrifuge 30 secondes à 130 000 rpm, on décante le surnageant et on ajoute 500 μ L de tampon RPE. Cette étape est répétée deux fois. Enfin, de manière à éluer l'ARNm, on ajoute 25 μ L d'eau RNase Free à chaque échantillon et on centrifuge le tout dans un nouveau tube afin de récupérer l'ARNm. Une fois de plus, ces échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à l'analyse QT-PCR en temps-réel réalisée par l'équipe de la plateforme Génomique de l'Institut de Recherche en Immunologie et

Cancérologie (IRIC). Cette réaction en chaîne par polymérase permet finalement, par une méthode d'amplification génique in vitro, de quantifier l'ARN messager présent dans l'échantillon.

Primers		
Gènes	Foward	Reverse
CYP3A6	AGCACTGGACTGAGCCTGATGAAT	AACCTCATGCCAAGGCAATTTCCGG
NPR	ACAAGACCTACGAGCACTTCAACG	AAGTCCTCCTCCAGGTTTGCATCA
CAR	ttgaacagtttgtgcatttcaa	ggcaaagactggtgatggat
RXRa	ggcaaggagaggaacgaga	tcttctccacgggcatgt
PXR	cagaatctctgcaggcccta	gcccagctcttcttggatct
PP2A	aacagtttgctgctgtatttg	cgcaaaaggagatggaaca

6. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes avec les erreurs standards (moyenne \pm erreur standard). L'analyse statistique des comparaisons entre les groupes expérimentaux et leurs témoins se fait par une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test « Student-Newman-Keuls ». Ce test exécute des comparaisons paires des moyennes de chaque groupe ce qui a pour effet de contrôler le taux d'erreur de l'ensemble. On considère qu'un p-value inférieur à 0,05 est suffisamment petit pour rejeter l'hypothèse nulle et ainsi conclure en un effet statistiquement significatif. Toutes les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel informatique SIGMA STAT.

7. Matériels

Le WME, le Krebs, l'EGTA (ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-etraacetic acid), le glucose, la collagène de type I, l'héparine, l'inhibiteur de trypsine, le percoll, le PD098059, l'HEPES, la glycine, le PD098059, l'acide okadaïque, le phénobarbital, la dexaméthasone, la rosiglitazone, le fénofibrate, l'acétate de plomb, le chlorure de cobalt et le tampon TRIS sont obtenus chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Le NaCl, le KCl, le KH₂PO₄, le CaCl₂, le pyruvate de sodium, l'acétonitrile, le méthanol, le DMSO et les plaques de cultures à 6, 24 et 96 puits proviennent de chez Fisher Scientific Canada (Ottawa, ON, Canada). Le sérum de veau et la pénicilline/streptomycine ont été achetés chez Gibco (Invitrogen cell culture, Burlington, ON, Canada), alors que la collagénase de type IV a été achetée chez Worthington Biochemicals (Lakewood, NJ, USA). La térébenthine provient de chez Recochem (Montréal, QC, Canada). Le DFB a été généreusement donné par Merck Frosst Canada (Kirkland, QC, Canada). L'anticorps monoclonal anti-CYP3A1 de rat produit par la souris a été obtenu chez Oxford Biochemical Research (Oxford, MI, USA). L'anticorps monoclonal anti-NADPH P450 réductase ainsi que l'anticorps secondaire anti-souris proviennent de Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA).

C. Résultats

1. Effets des activateurs des PPAR γ , PPAR α , HIF-1 et AP-1 sur l'expression et l'activité de la NPR et du CYP3A6.

Afin d'évaluer le rôle potentiel de PPAR γ , PPAR α , HIF-1 et AP-1 dans la modulation de l'expression et de l'activité de la NPR et du CYP3A6, nous avons incubé pendant 48 heures des hépatocytes provenant de lapins contrôles avec des activateurs spécifiques à chaque facteur de transcription. La rosiglitazone (Rosi), le fénofibrate (Feno), l'acétate de plomb (Lead) et le chlorure de cobalt (CoCl₂) sont respectivement des activateurs spécifiques de PPAR γ , de PPAR α , de AP-1 et du HIF-1.

a. NPR

Après 48 heures d'incubation, par rapport aux témoins, l'activation de l'un ou l'autre des quatre facteurs de transcription par leurs activateurs spécifiques respectifs ne provoque aucun changement statistiquement significatif d'expression de la NPR (figure 12). On constate que ces produits ne provoquent également aucun changement significatif de l'activité de la NPR (Figure 13). Les mesures de l'expression ainsi que de l'activité enzymatique de la protéine sont exprimées en pourcentage par rapport à la situation contrôle.

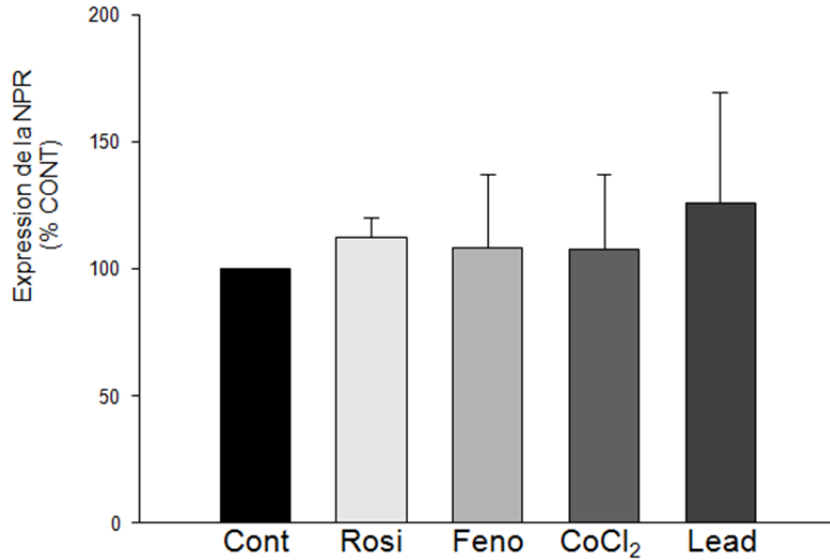


Figure 12. Expression de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 50 μ M de rosiglitazone (Rosi), 100 μ M de fénofibrate (Feno), 150 μ M de chlorure de cobalt (CoCl₂) et 10 μ M d'acétate de plomb (Lead). N= 6 par groupe.

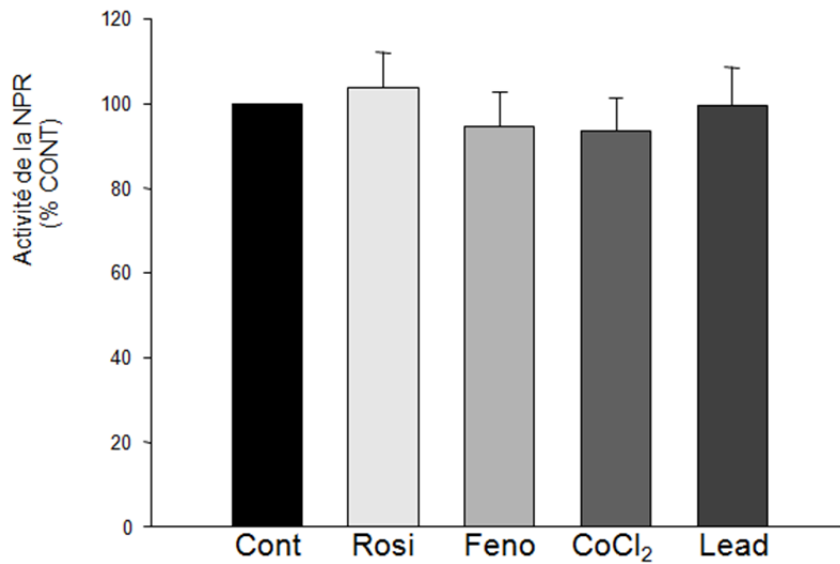


Figure 13. Activité de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 50 μ M de rosiglitazone (Rosi), 100 μ M de fénofibrate (Feno), 150 μ M de chlorure de cobalt (CoCl₂) et 10 μ M d'acétate de plomb (Lead). N= 6 par groupe.

b. CYP3A6

La figure 14 illustre les changements d'expression de l'isoforme CYP3A6 dans des hépatocytes de lapins contrôles incubés pendant 48 heures en présence et en absence des inducteurs spécifiques. On observe que l'activation de PPAR γ par la rosiglitazone induit une augmentation statistiquement significative d'environ 20 % de l'expression du CYP3A6 par rapport à la situation contrôle. L'activation de PPAR α , de HIF-1 ou d'AP-1 ne provoque cependant aucun changement significatif d'expression de la protéine.

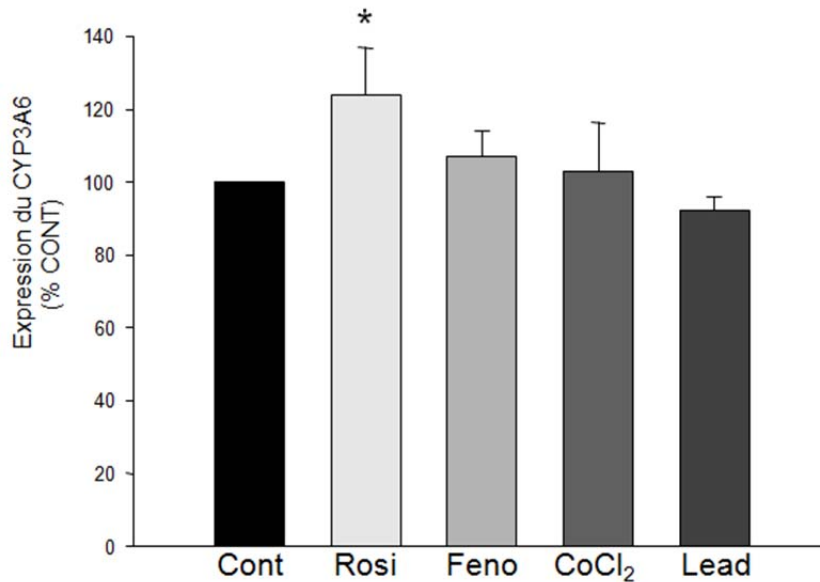


Figure 14. Expression du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 50 μ M de rosiglitazone (Rosi), 100 μ M de fénofibrate (Feno), 150 μ M de chlorure de cobalt (CoCl₂) et 10 μ M d'acétate de plomb (Lead). N= 6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

Pour ce qui est de l'activité du CYP3A6 (Figure 15), l'activation de PPAR γ et de PPAR α par la rosiglitazone et le fénofibrate produit une augmentation d'environ 20 % de l'activité du CYP3A6 par rapport à la situation contrôle (p <0,05). L'activation de HIF-1

et d'AP-1 par le chlorure de cobalt et l'acétate de plomb ne provoque aucun changement significatif d'activité du CYP3A6.

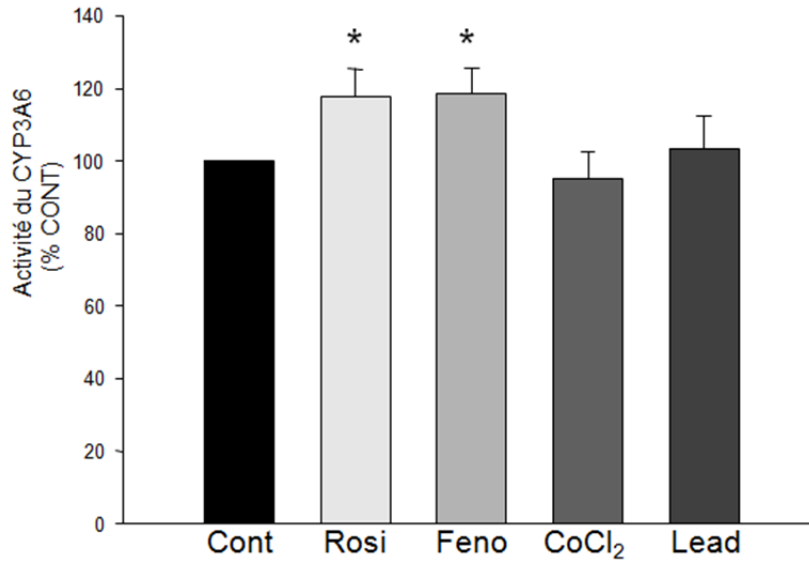


Figure 15. Activité du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 50 μ M de rosiglitazone (Rosi), 100 μ M de fénofibrate (Feno), 150 μ M de chlorure de cobalt (CoCl₂) et 10 μ M d'acétate de plomb (Lead). N= 6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

2. Effets du phénobarbital et de la dexaméthasone sur l'expression et l'activité de la NPR.

Toujours dans l'optique de mieux comprendre comment sont modulés la NPR et le CYP3A6, nous avons incubé pendant 48 heures des hépatocytes de lapins contrôles avec un inducteur connu des CYP, le phénobarbital (PB), en présence et en absence d'une concentration nanomolaire de dexaméthasone (Dexa).

a. NPR

Puisque l'intérêt principal de cette étude est la NPR, la première étape fut de déterminer par une courbe dose-réponse les concentrations de PB capables d'augmenter l'activité de la NPR après 48 heures d'incubation. Différentes concentrations ont été testées, mais comme le démontre la figure 16, l'induction maximale du Pb a été observée avec des concentrations de 5 et 10 mM.

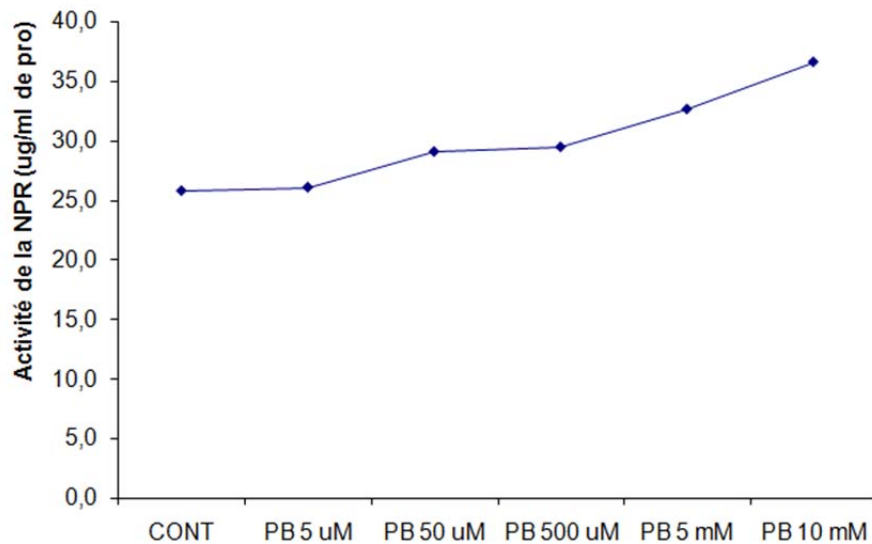


Figure 16. Activité de la NPR exprimée en molécules de cytochrome c réduites par minute par 10^6 cellules par $\mu\text{g/ml}$ de protéines mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans phénobarbital (PB). N=1.

Une fois cette étape complétée, nous avons mesuré l'ARNm, l'expression ainsi que l'activité de la NPR dans des hépatocytes provenant de lapins contrôles en présence et en absence de 100 nM de Dexa, de 5 mM de PB et de 10 mM de PB après 48 heures d'incubation. On observe dans la figure 17 que la Dexa seule et la combinaison Dexa + 10 mM PB augmentent de manière statistiquement significative l'ARNm de la NPR d'environ 70 et 50 % respectivement par rapport au contrôle. Il est intéressant de noter

que suite à 48 heures d'incubation, la quantité d'ARNm de la *NPR* est inférieure en présence de PB seul qu'en absence de PB (Cont) (diminution d'environ 40-50 % avec les deux concentrations de PB, $p < 0,05$).

La figure 18 illustre quant à elle l'expression protéique de la *NPR* mesurée par rapport à la situation contrôle. L'expression de la *NPR* est augmentée d'environ 80 % par la combinaison de Dexa + 10 mM PB ($p < 0,05$). Les autres conditions semblent également augmenter l'expression protéique de la *NPR* mais les résultats ne sont pas statistiquement significatifs.

Enfin, la figure 19 illustre que par rapport au contrôle, l'activité de la *NPR* est supérieure suite à l'incubation des hépatocytes de lapins avec la Dexa seule (15%), 10 mM de PB seul (20%), la Dexa + 5 mM de PB (20 %) ou la Dexa + 10 mM de PB (30%) ($p < 0,05$). À noter que l'activité de la *NPR* en présence de PB 10 mM ou de Dexa + 5 et 10 mM de PB est supérieure à l'activité de la *NPR* incubé avec la Dexa seul ($p < 0,05$).

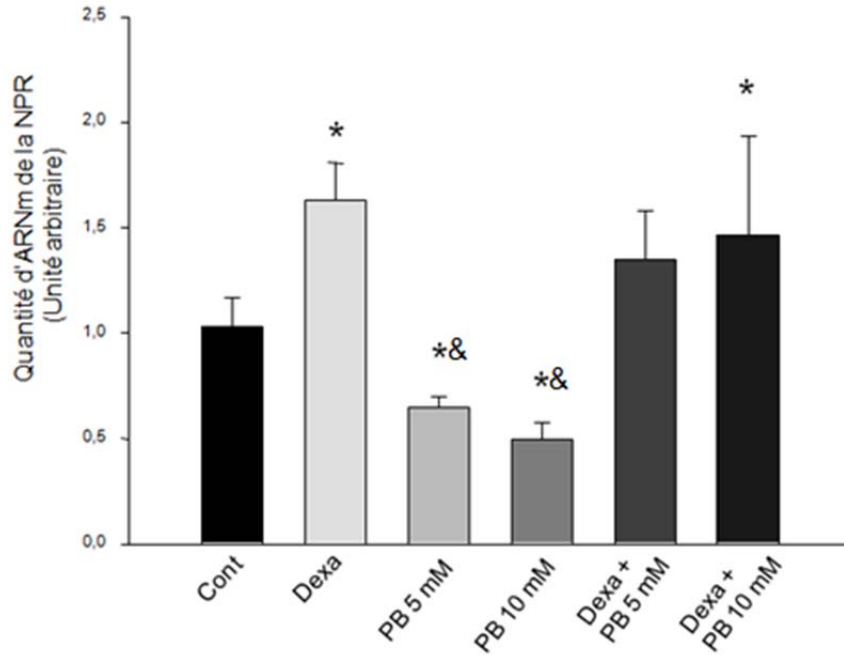


Figure 17. Quantité d'ARNm de la *NPR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles (Cont) après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont. & p <0,05 comparé à Dexa.

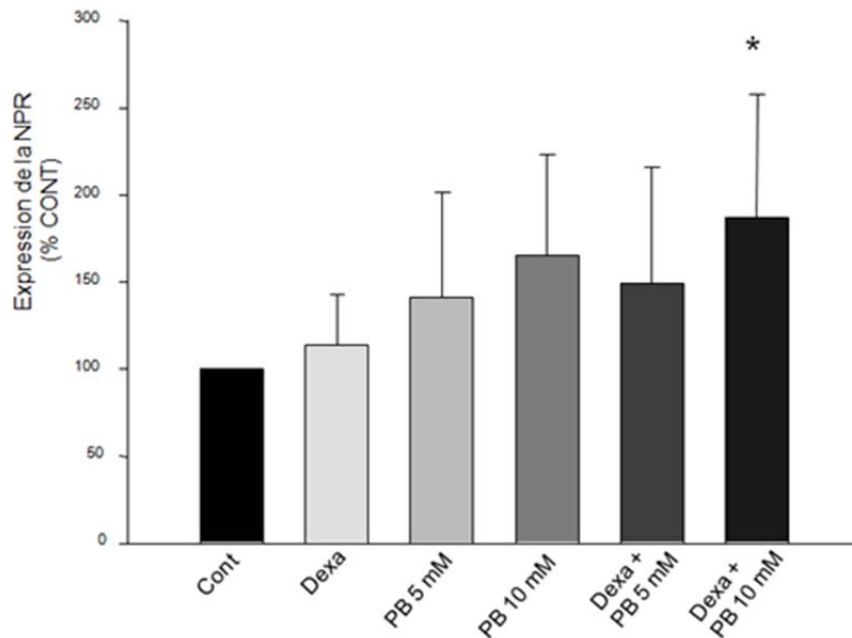


Figure 18. Expression de la *NPR* (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

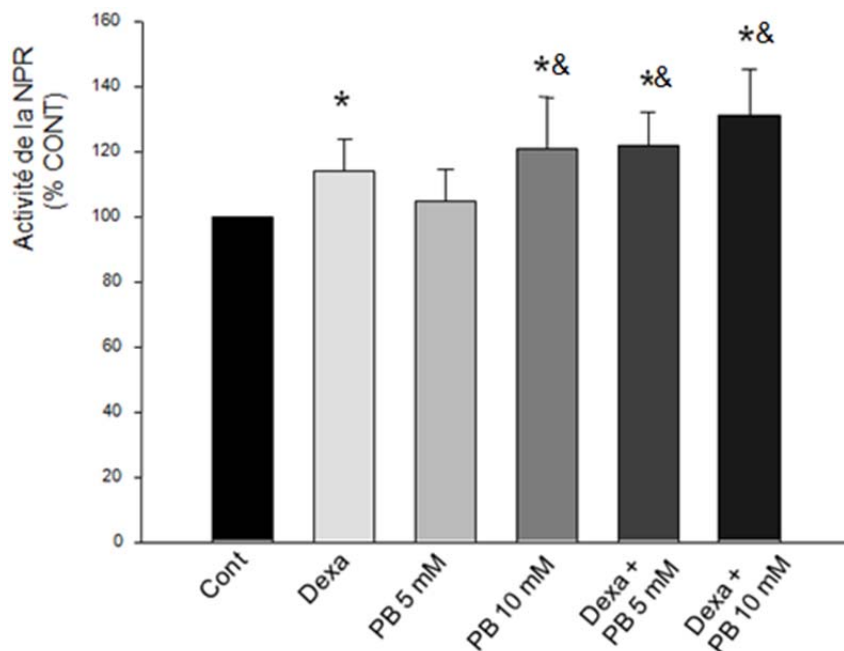


Figure 19. Activité de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d’incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont. & p <0,05 comparé à Dexa.

b. CYP3A6

Les mêmes mesures d’ARNm, d’expression protéique et d’activité du CYP3A6 ont par la suite été faites en présence de Dexa et de PB. La Dexa ne produit aucune augmentation notable de la quantité d’ARNm du CYP3A6 (figure 20). Le PB aux concentrations de 5 et 10 mM ainsi que la combinaison Dexa + 10 mM PB entraînent une augmentation de la quantité d’ARNm de l’isoforme mais, bien qu’assez importante, cette différence n’atteint pas le seuil de la signification statistique ($p > 0,05$).

Concernant l’expression protéique du CYP3A6 (figure 21), la Dexa ne modifie pas cette mesure. Le PB aux concentrations de 5 et 10 mM, ainsi que la combinaison Dexa + 5 mM PB produisent une discrète augmentation de l’expression du CYP3A6, différence qui

n'atteint pas le seuil de la signification statistique ($p > 0,05$). Par ailleurs, comparativement au contrôle, la combinaison Dexaméthasone + 10 mM Phénobarbital produit une augmentation d'environ 120 % de l'expression protéique du CYP3A6 ($p < 0,05$).

Finalement, l'activité du CYP3A6 n'est pas modifiée par la Dexaméthasone (figure 22). On note toutefois que le Phénobarbital 5 mM et les combinaisons Dexaméthasone + 5 et 10 mM Phénobarbital produisent des augmentations statistiquement significatives de l'activité du CYP3A6, soit respectivement d'environ 50, 90 et 70 % ($p < 0,05$).

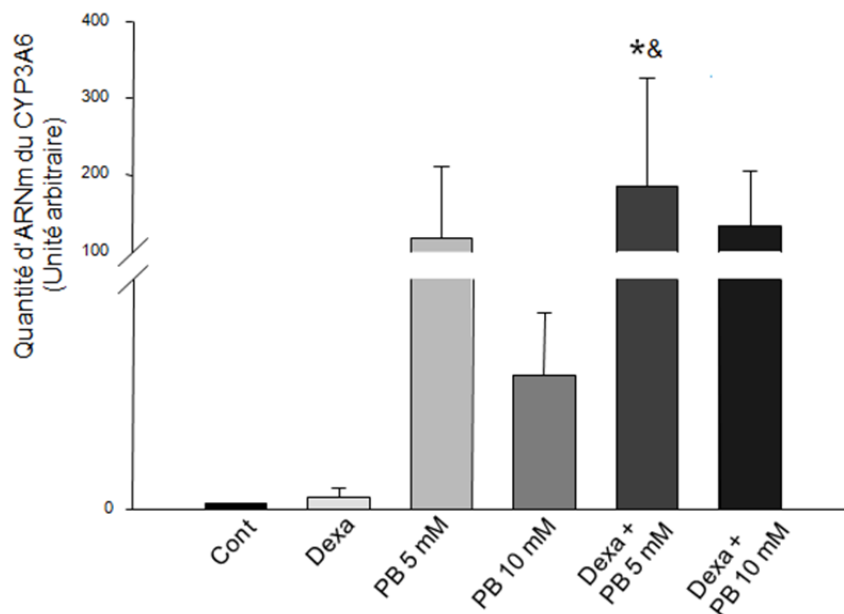


Figure 20. Quantité d'ARNm du *CYP3A6* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. * $p < 0,05$ comparé à Cont. & $p < 0,05$ comparé à Dexa.

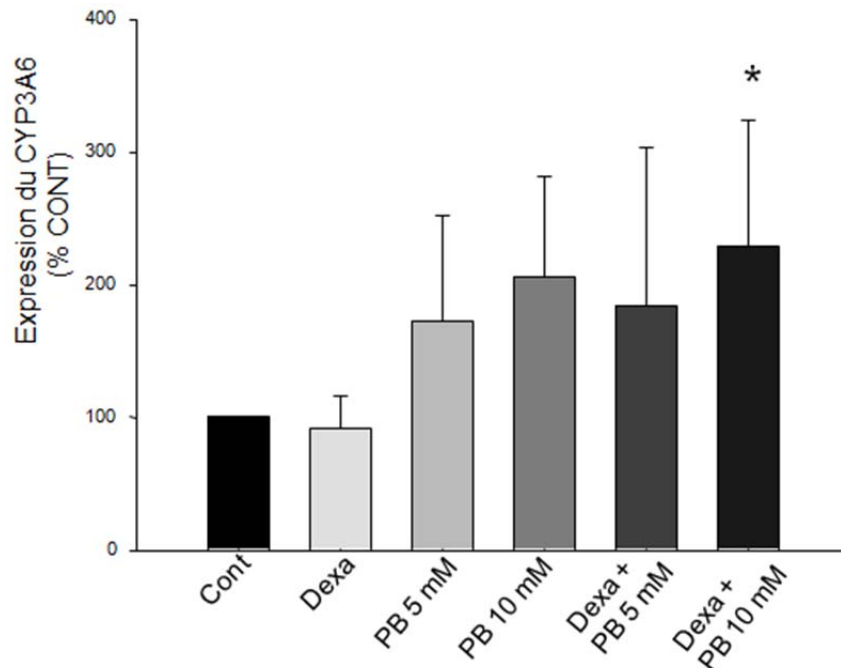


Figure 21. Expression du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

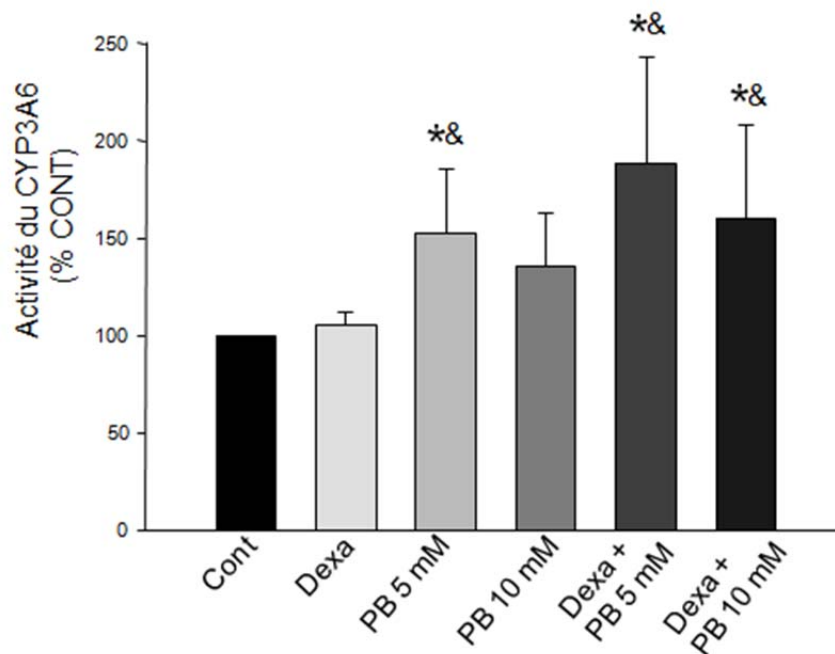


Figure 22. Activité du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont. & p <0,05 comparé à Dexa.

c. *CAR, PXR, RXR α et PP2A*

Afin de mieux comprendre comment l'expression de la NPR et du CYP3A6 sont modulées par le PB et la Dexa, nous avons mesuré la quantité d'ARNm des récepteurs nucléaires *CAR*, *PXR* et *RXR α* en plus de la *protéine phosphatase 2A*, dans des hépatocytes de lapins témoins suite à l'incubation pendant 48 heures avec le PB et la Dexa. La quantité d'ARNm de *CAR* est environ dix fois supérieure en présence de Dexa seule comparativement à la situation contrôle (Figure 23, $p < 0,05$). Le PB (5 et 10 mM) ou la combinaison Dexa + PB n'ont pas modifié la quantité d'ARNm de *CAR*.

La figure 24 nous montre que par rapport au contrôle, la concentration nanomolaire de Dexa et la combinaison Dexa + 5 mM de PB augmentent de manière statistiquement significative la quantité d'ARNm de *PXR* ($p < 0,05$). Par ailleurs, le PB (5 et 10 mM) ou la combinaison Dexa + 10 mM de PB n'ont pas modifié la quantité d'ARNm de *PXR*. Par rapport au contrôle, suite à 48 heures d'incubation avec la Dexa ou le PB, la quantité d'ARNm du récepteur nucléaire *RXR α* (Figure 25) et de la *protéine phosphatase 2A* (*PP2A*) (Figure 26) dans les hépatocytes n'a pas changée.

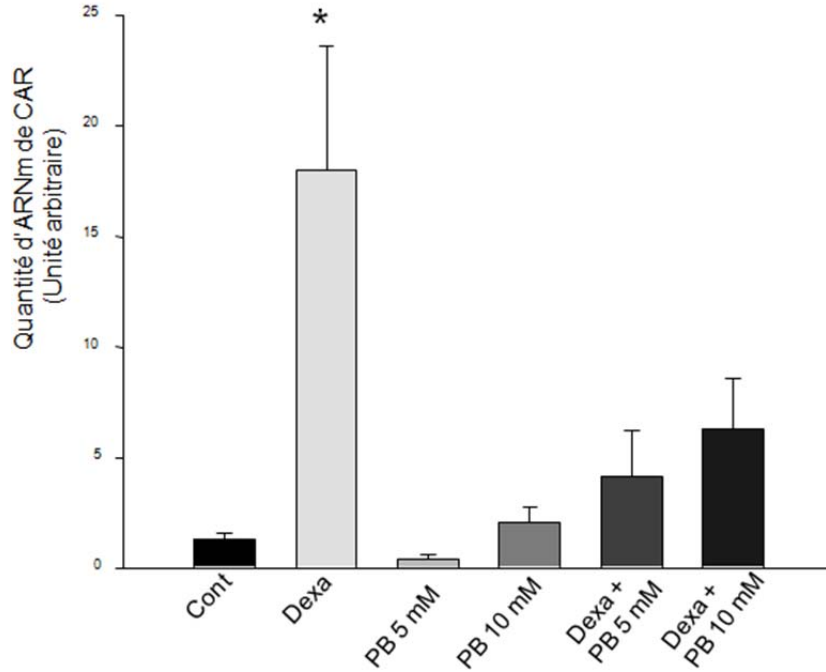


Figure 23. Quantité d'ARNm de *CAR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p < 0,05 comparé à Cont.

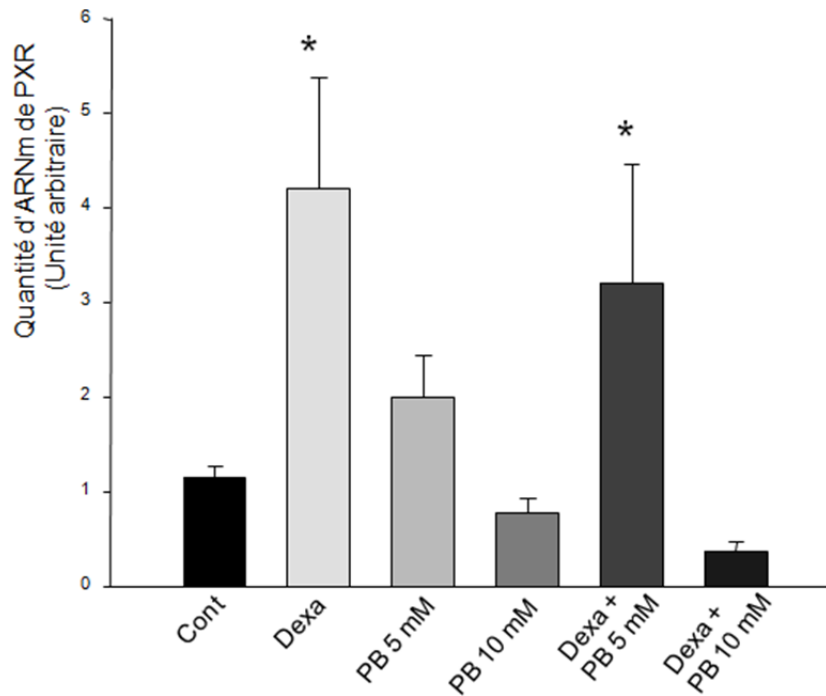


Figure 24. Quantité d'ARNm de *PXR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe. *p < 0,05 comparé à Cont.

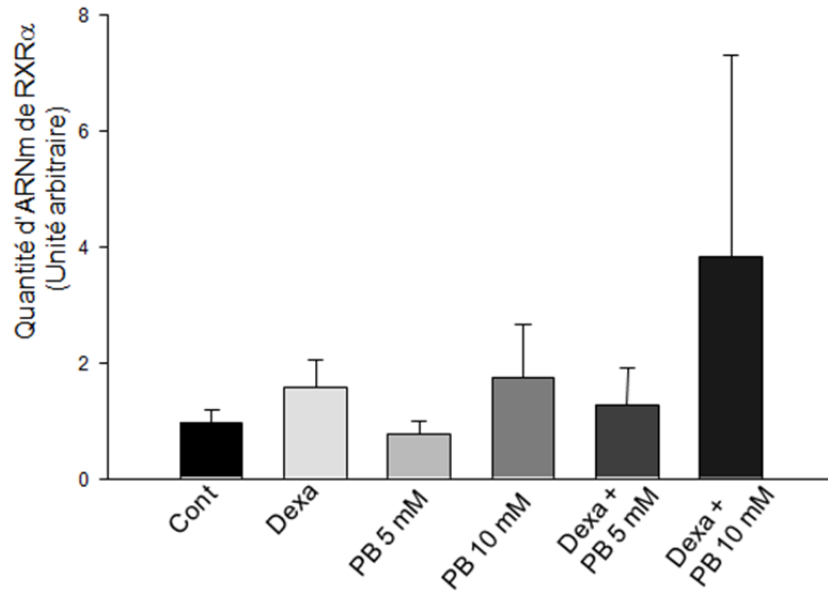


Figure 25. Quantité d'ARNm de *RXRα* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe.

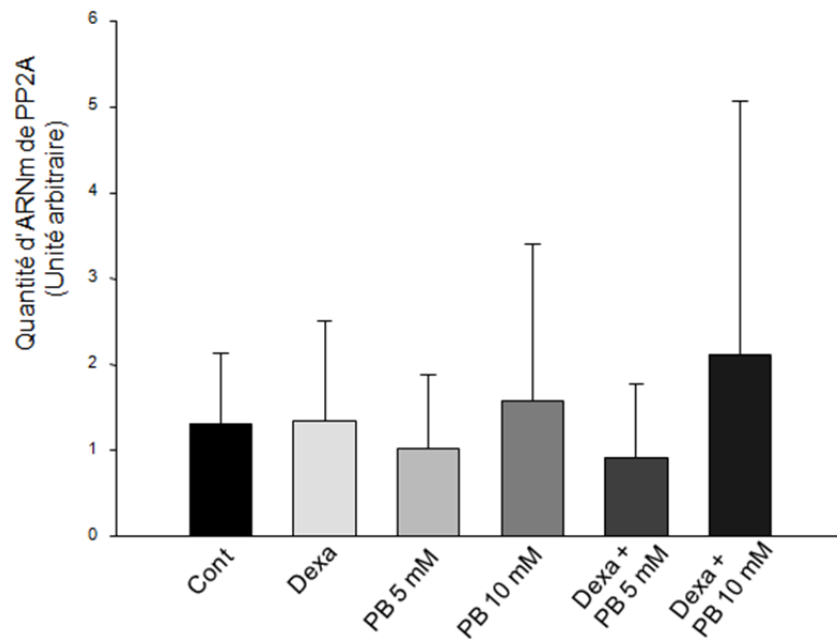


Figure 26. Quantité d'ARNm de *PP2A* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa), 5 mM et 10 mM de phénobarbital (PB) ou la combinaison des deux. N=6 par groupe.

3. Effets du phénobarbital et de la dexaméthasone sur la NPR en fonction du temps d'incubation.

Les résultats discutés jusqu'à maintenant montrent que la Dexaméthasone augmente l'ARNm de la NPR et que le Phénobarbital tend à augmenter l'expression de la NPR tout en diminuant l'ARNm de la NPR, suggérant que le PB pourrait agir post-transcriptionnellement. Alternativement, le PB aurait pu augmenter l'ARNm de la NPR précocement, avant 48 heures. Les expériences suivantes avaient pour but d'analyser le déroulement chronologique des effets inducteurs de la Dexaméthasone et du PB. Pour se faire, nous avons incubé des hépatocytes provenant de lapins contrôles mais cette fois-ci pendant 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec et sans 100 nM de Dexaméthasone ou la combinaison Dexaméthasone + 10 mM de PB.

a. NPR

La figure 27 montre la quantité d'ARNm de la NPR. Des augmentations significatives de la quantité d'ARNm de la NPR sont détectées dès la deuxième heure d'incubation avec la Dexaméthasone, ainsi qu'avec la combinaison Dexaméthasone + 10 mM PB ($p < 0,05$). Après 4 heures et 24 heures d'incubation avec la Dexaméthasone, la quantité d'ARNm de la NPR ne diffère plus de celle observée dans les hépatocytes témoins. Au contraire, suite à 4 heures et 24 heures d'incubation avec la Dexaméthasone + 10 mM de PB, la quantité d'ARNm de la NPR se maintient plus élevée que celle observée dans les hépatocytes témoins. Après 48 heures d'incubation, ni la Dexaméthasone ni la Dexaméthasone + 10 mM PB augmentent l'ARNm de la NPR, résultats qui contrastent avec les ceux obtenus antérieurement (figure 17).

Concernant l'expression protéique de la NPR, après 48 heures d'incubation, on confirme l'effet inducteur de la combinaison Dexa + 10 mM PB décrit préalablement dans la figure 18; de plus, par comparaison au contrôle, la Dexa a produit une augmentation statistiquement significative de l'expression de la NPR (figure 28). Aucun changement d'expression de la protéine NPR n'a lieu avant 48 heures d'incubation entre les différentes conditions.

En accord avec l'augmentation de l'expression de la NPR, la Dexa augmente l'activité de la NPR à 48 heures (figure 29). Par contre, l'effet inducteur de la combinaison Dexa + 10 mM PB sur l'activité enzymatique de la NPR est apparent dès 24 heures ($p < 0,05$) et continue à être mesuré à 48 heures d'incubation.

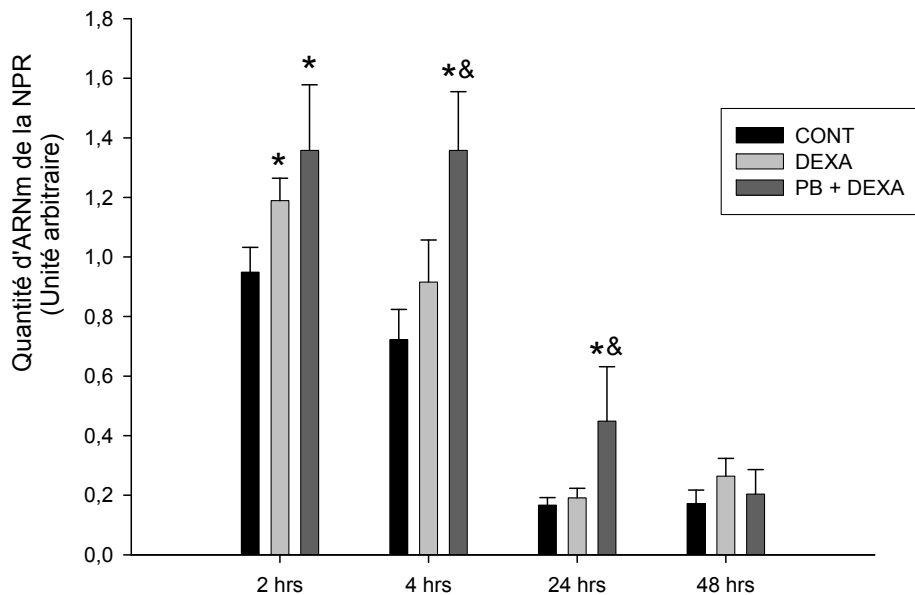


Figure 27. Quantité d'ARNm de la *NPR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. * $p < 0,05$ comparé à CONT. & $p < 0,05$ comparé à Dexa.

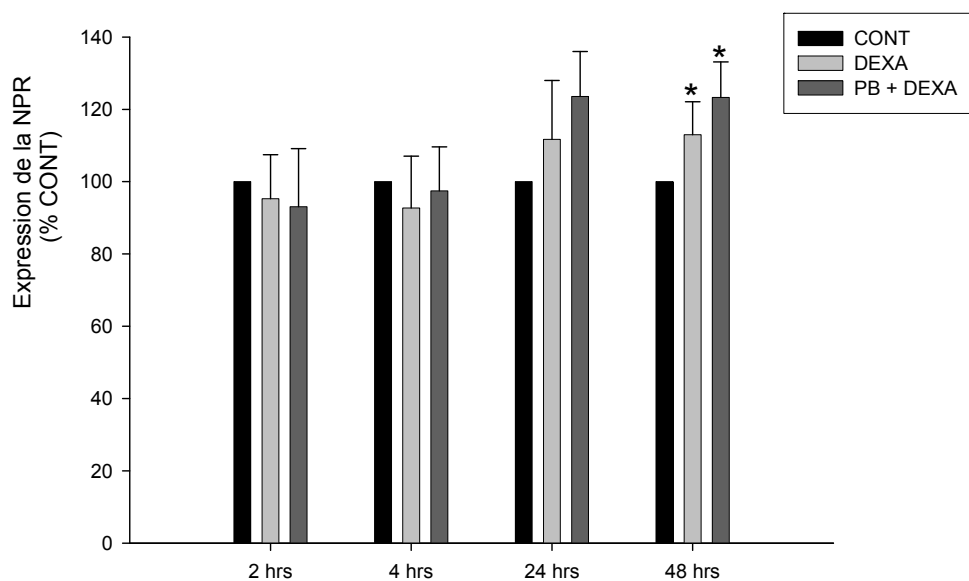


Figure 28. Expression de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – CONT) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

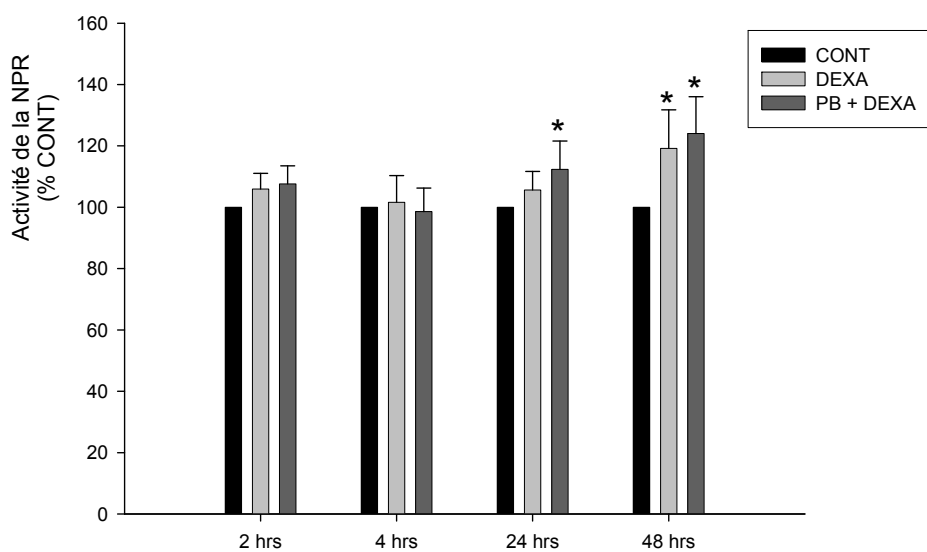


Figure 29. Activité de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – CONT) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

b. CYP3A6

L'ARNm du *CYP3A6* n'est pas modifié à aucun temps par la Dexaméthasone (Dexa) (figure 30). Par ailleurs, l'augmentation de l'ARNm du *CYP3A6* par la combinaison Dexa + 10 mM Phénobarbital (PB) est déjà observée dès la deuxième heure d'incubation et la quantité d'ARNm demeure toujours statistiquement supérieure au contrôle jusqu'à 48 heures.

La Dexa ne produit aucun changement de l'expression du *CYP3A6* et cela à aucun des temps étudiés (figure 31). D'un autre côté, la Dexa + 10 mM PB augmente l'expression de la protéine *CYP3A6* après 48 heures d'incubation ($p < 0,05$).

Finalement, la Dexa ne modifie pas l'activité du *CYP3A6* à aucun temps et cela jusqu'à 48 heures (Figure 32). La Dexa + 10 mM PB produit un effet biphasique sur l'activité enzymatique du *CYP3A6*, c'est-à-dire, la combinaison diminue l'activité à 2 et 4 heures et l'augmente après 48 heures d'incubation (Figure 32, $p < 0,05$).

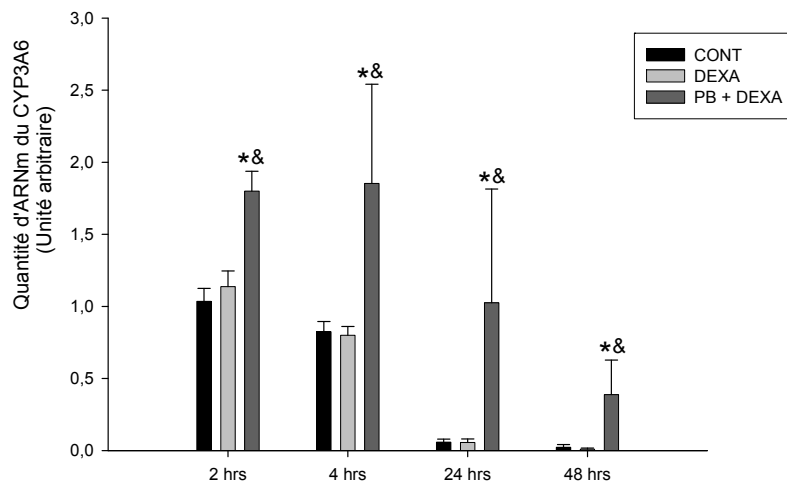


Figure 30. Quantité d'ARNm du *CYP3A6* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. * $p < 0,05$ comparé à CONT. & $p < 0,05$ comparé à Dexa.

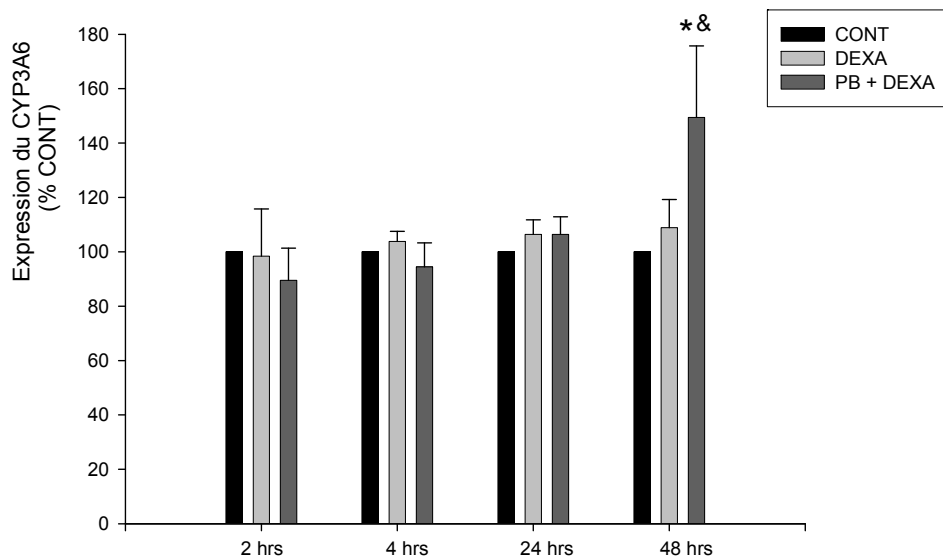


Figure 31. Expression du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – CONT) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d’incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

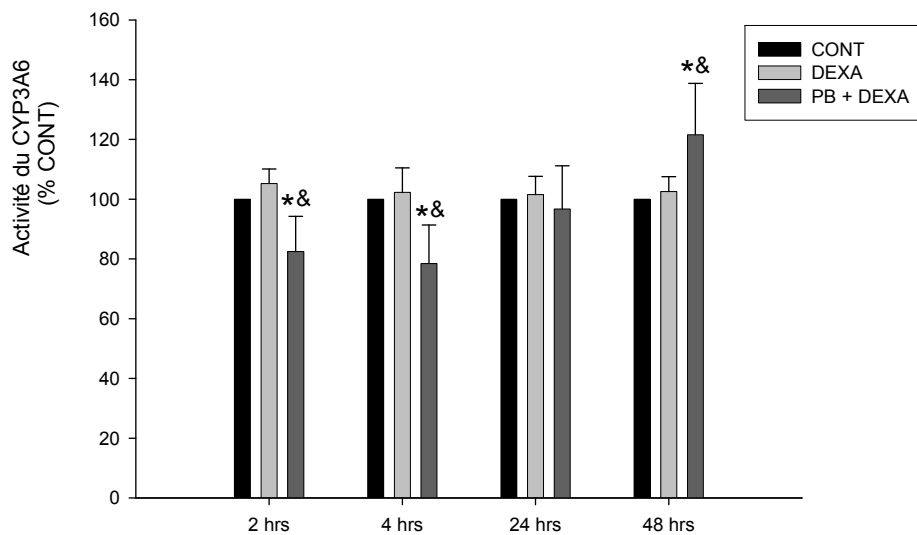


Figure 32. Activité du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – CONT) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d’incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

c. *CAR, PXR, RXR α et PP2A*

L'effet de 100 nM de Dexa et de la combinaison Dexa + 10 mM de PB sur la quantité d'ARNm des récepteurs nucléaires *CAR*, *PXR* et *RXR α* ainsi que de la *PP2A* a aussi été caractérisé en fonction du temps, c'est-à-dire après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation dans des hépatocytes de lapins contrôles. On observe dans la figure 33 une augmentation statistiquement significative de l'ARNm de *CAR* par Dexa + 10 mM PB après 2 et 4 heures d'incubation, tandis que la Dexa ne change pas l'ARNm de *CAR*. Après 48 heures, ni la Dexa ni la combinaison Dexa + 10 mM de PB modifient l'ARNm de *CAR*. La Dexa ne change pas l'ARNm de *PXR* à aucun des temps étudiés (figure 34). Par contre, la combinaison Dexa + 10 mM PB augmente l'ARNm de *PXR* après 2 et 4 heures d'incubation ($p < 0,05$), effet qui ne s'observe plus après 24 et 48 heures d'incubation.

La Dexa ne change pas l'ARNm de *RXR α* à aucun des temps étudiés (figure 35). La combinaison Dexa + 10 mM PB induit la quantité d'ARNm de *RXR α* dès les 2 heures, augmentation qui persiste jusqu'à 24 heures d'incubation.

Enfin, par comparaison aux témoins, on constate dans la figure 36 que la quantité d'ARNm de la *protéine phosphatase 2A* n'est pas modifiée significativement par aucun des deux inducteurs, Dexa et la combinaison Dexa + 10 mM de PB.

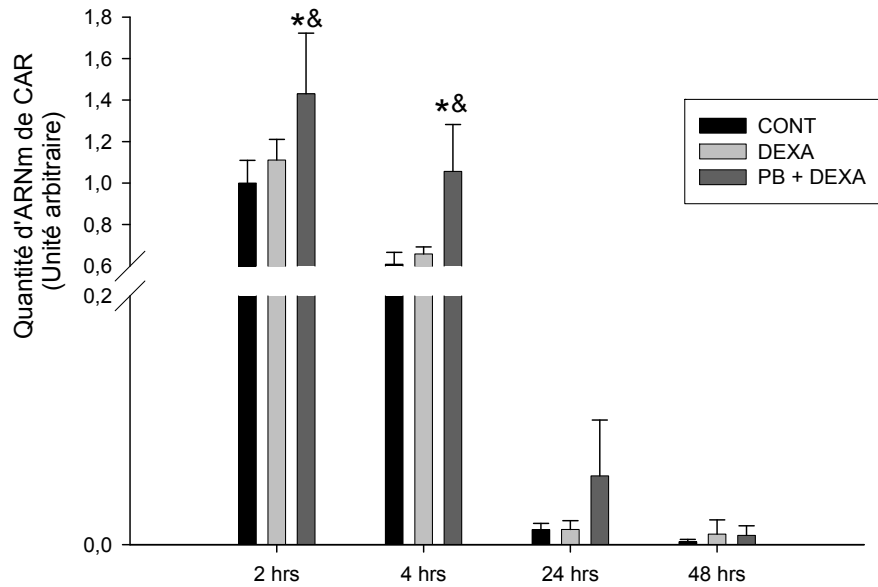


Figure 33. Quantité d'ARNm de *CAR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

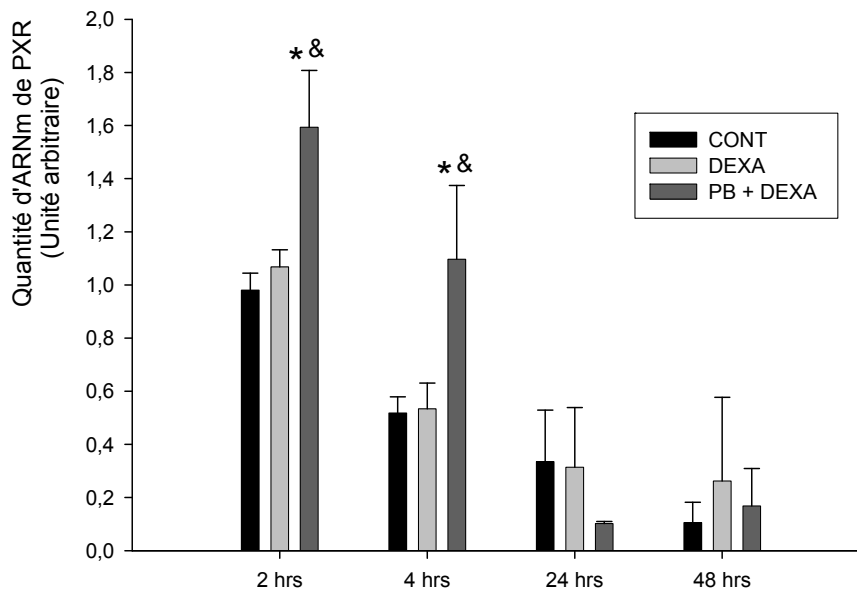


Figure 34. Quantité d'ARNm de *PXR* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

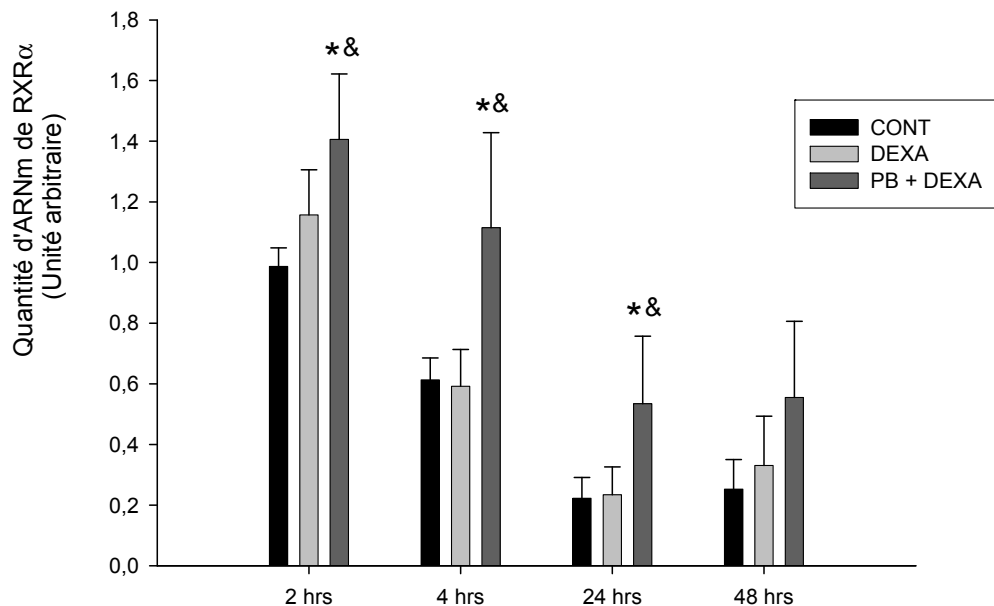


Figure 35. Quantité d'ARNm de *RXRα* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT. & p <0,05 comparé à Dexa.

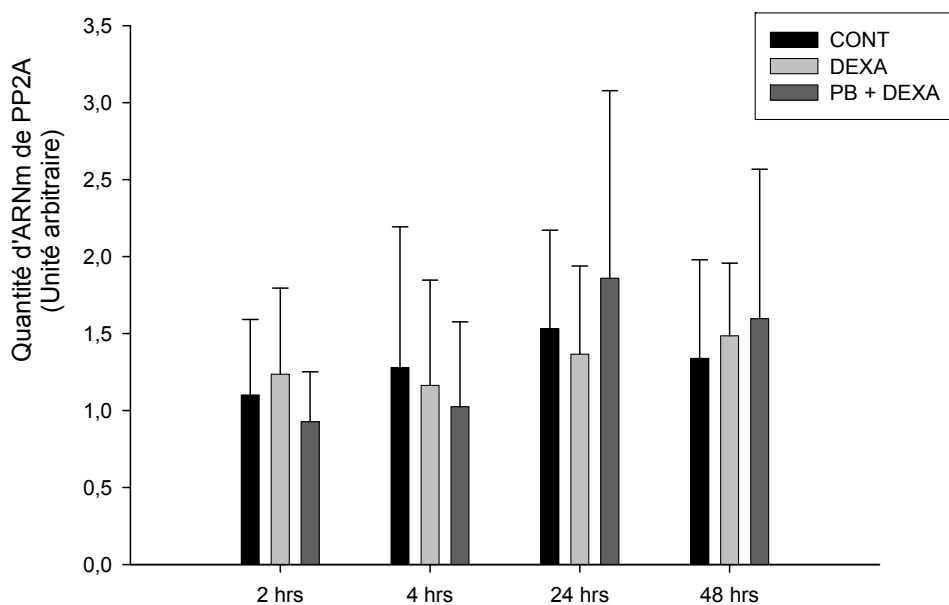


Figure 36. Quantité d'ARNm de *PP2A* exprimée en unités arbitraires par rapport à un calibrateur contrôle mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation avec ou sans 100 nM de dexaméthasone (Dexa) seul ou en combinaison avec 10 mM de phénobarbital (PB). N=6 par groupe.

4. Voies de signalisations impliquées dans l'expression de la NPR et du CYP3A6.

Étant donné que la PP2A et Erk1/2 sont impliquées l'induction enzymatique produite par le PB, il paraissait intéressant déterminer si la phosphatase et la voie d'Erk étaient nécessaire à la modulation de l'expression et l'activité de la NPR par le PB et la Dexa (figures 37, 38). Par comparaison aux témoins après 48 heures d'incubation, le PB 10 mM a augmenté de manière statistiquement significative l'expression et l'activité de la NPR ($p < 0,05$). Toutefois, bien que la Dexa 100 nM a engendré de légères augmentations de l'expression et de l'activité de la NPR, celles-ci n'atteignent pas le seuil de la signification statistique ($p > 0,05$). L'ajout du PD (inhibiteur de l'activation Erk1/2) ou de l'AO (inhibiteur de la PP2A) seuls n'a eut aucun effet sur la NPR, mais lorsque combinés au PB 10 mM, ces deux produits bloquent l'induction d'expression et d'activité provoquée par le PB.

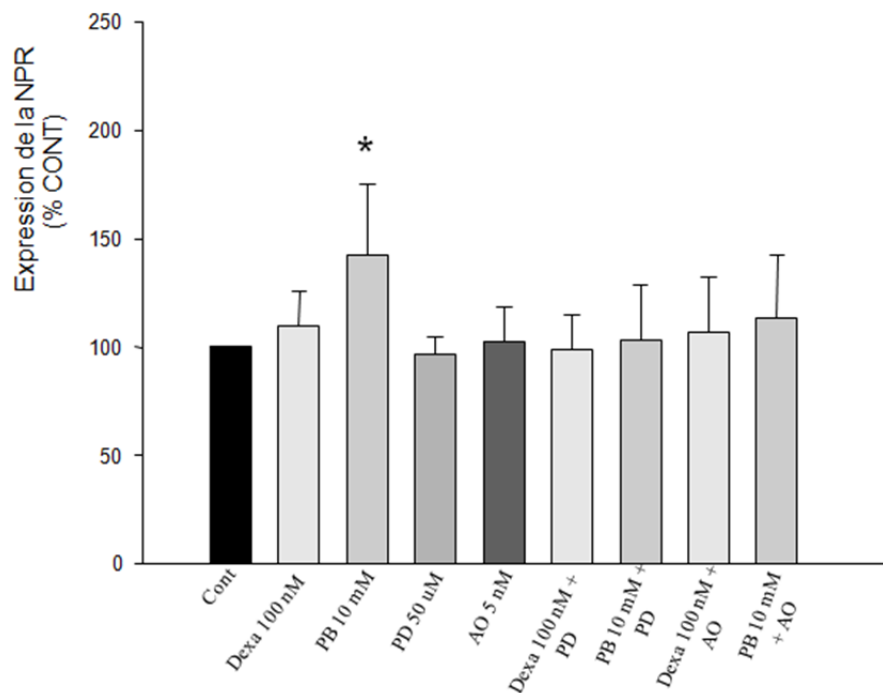


Figure 37. Expression de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d’incubation avec ou sans dexaméthasone (Dexta), phénobarbital (PB), PD098059 (PD), acide okadaïque (AO) ou leur combinaison. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

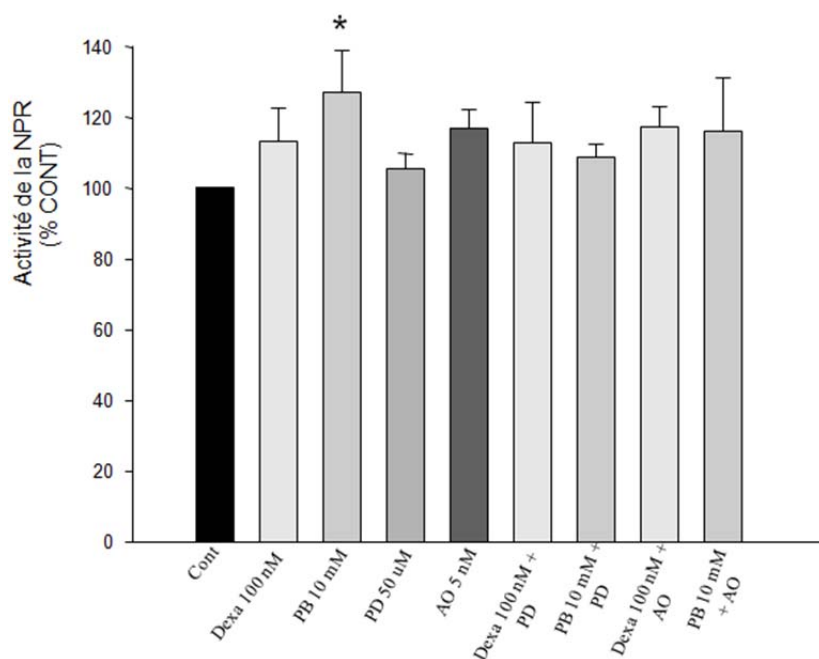


Figure 38. Activité de la NPR (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d’incubation avec ou sans dexaméthasone (Dexta), phénobarbital (PB), PD098059 (PD), acide okadaïque (AO) ou leur combinaison. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à Cont.

Ces mêmes études ont ensuite été répétées pour vérifier le rôle de la PP2A et d'Erk1/2 dans l'augmentation de l'expression et l'activité du CYP3A6 par le PB (figures 39, 40). Le PB 10 mM augmente l'expression et l'activité du CYP3A6 d'environ 40 et 50 %, respectivement, comparativement aux témoins ($p < 0,05$). La Dexa 100 nM ne produit aucun changement d'expression ou d'activité du CYP3A6 après 48 heures d'incubation. L'ajout du PD ou de l'AO seuls n'a eut aucun effet. Par ailleurs, la combinaison PB 10 mM + PD ne bloque pas l'effet inducteur du PB sur l'expression et l'activité du CYP3A6. Cependant, combiner l'AO au PB 10 mM a pour effet d'atténuer l'augmentation d'expression et d'activité du CYP3A6 induites par le PB 10 mM.

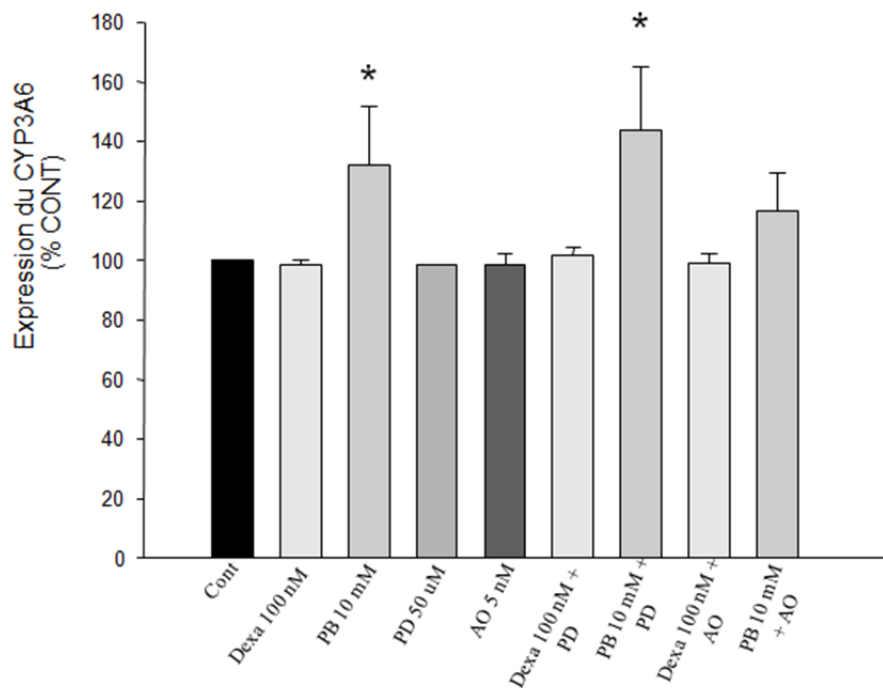


Figure 39. Expression du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans dexaméthasone (Dexa), phénobarbital (PB), PD098059 (PD), acide okadaïque (AO) ou leur combinaison. N=4 par groupe. * $p < 0,05$ comparé à Cont.

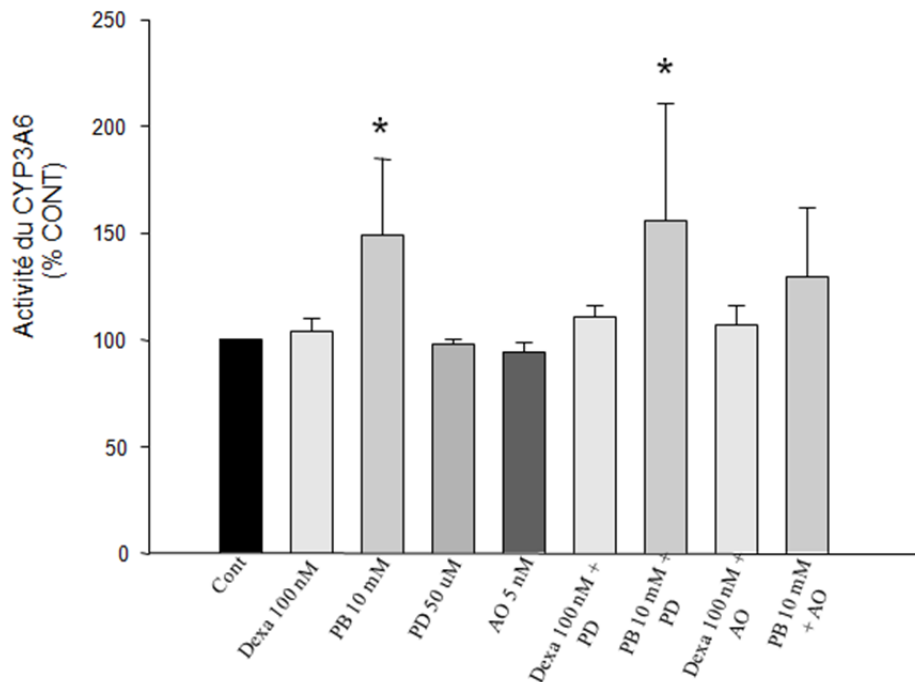


Figure 40. Activité du CYP3A6 (exprimée en % par rapport au contrôle – Cont) mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles après 48 heures d'incubation avec ou sans dexaméthasone (Dexa), phénobarbital (PB), PD098059 (PD), acide okadaïque (AO) ou leur combinaison. N=4 par groupe. *p < 0,05 comparé à Cont.

5. Effets de la réaction inflammatoire sur l'expression et l'activité de la NPR et du CYP3A6.

Pour terminer, nous avons étudié les effets de l'inflammation produite par la térébenthine sur l'expression et l'activité de la NPR et du CYP3A6 (figures 41, 42, 43 et 44). La réaction inflammatoire diminue de manière statistiquement significative l'expression et l'activité de la NPR comparativement aux témoins ($p < 0,05$). De plus, la réaction inflammatoire diminue l'expression et l'activité du CYP3A6 ($p < 0,05$).

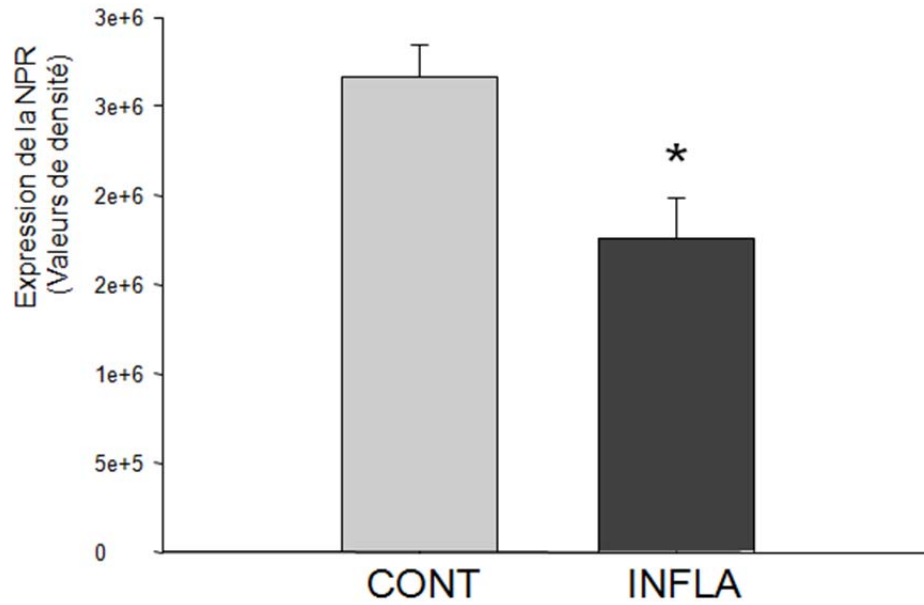


Figure 41. Expression de la NPR exprimée en unités arbitraires de densité mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles (CONT) et de lapins avec une réaction inflammatoire (INFLA) après 48 heures d'incubation. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

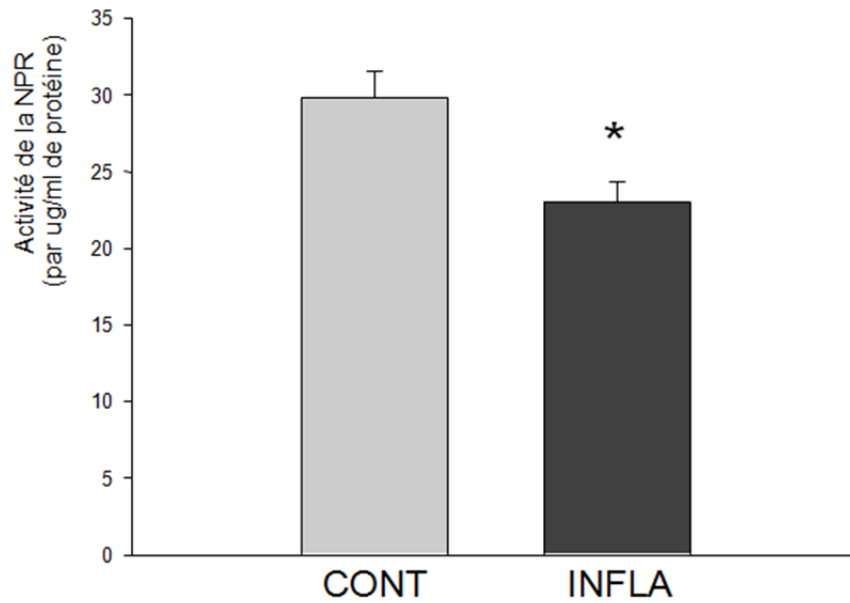


Figure 42. Activité de la NPR exprimée en molécules de cytochrome c réduites par minute par 10^6 cellules par ug/ml de protéines mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles (CONT) et de lapins avec une réaction inflammatoire (INFLA) après 48 heures d'incubation. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

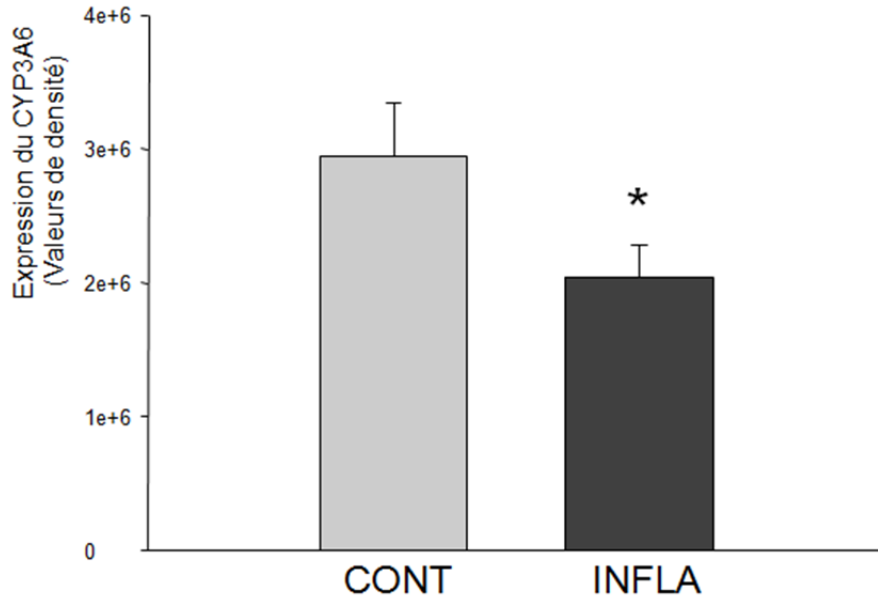


Figure 43. Expression du CYP3A6 exprimée en unités arbitraires de densité mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles (CONT) et de lapins avec une réaction inflammatoire (INFLA) après 48 heures d'incubation. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

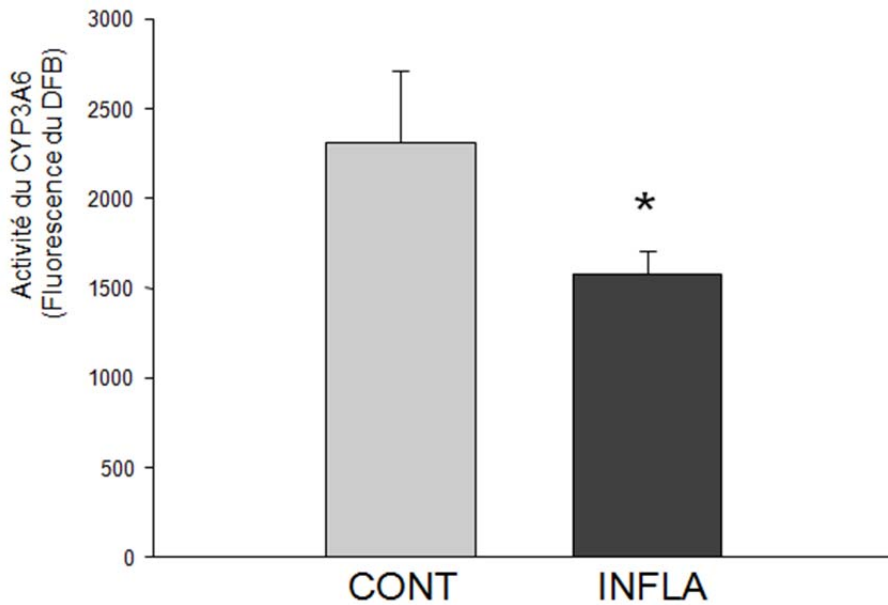


Figure 44. Activité du CYP3A6 exprimée en fluorescence du DFB mesurée dans des hépatocytes de lapins contrôles (CONT) et de lapins avec une réaction inflammatoire (INFLA) après 48 heures d'incubation. N=4 par groupe. *p <0,05 comparé à CONT.

D. Discussion

Ce projet de recherche vise à étudier la modulation de l'activité et de l'expression de la NPR. Afin d'assumer leur fonction de biotransformation des substrats, les enzymes du cytochrome P450 requièrent la NPR pour le transfert d'électrons lors du cycle catalytique, c'est à dire, la NPR est essentielle au fonctionnement du cytochrome P450. Il devient alors intéressant de saisir via quels mécanismes cette flavoprotéine est régulée à l'intérieur de la cellule et comment ceci peut affecter le métabolisme des médicaments.

Contrairement à la modulation du cytochrome P450, très peu d'études se sont attardées à la régulation de la NPR. Néanmoins, on peut supposer qu'un dérèglement de cette protéine pourrait engendrer d'importantes répercussions, tout comme avec les CYP, telles que l'accumulation dans l'organisme des xénobiotiques éliminés par le cytochrome P450 avec apparition d'effets indésirables. Dans l'optique d'analyser la régulation cellulaire de la NPR, nous avons donc étudié les effets de plusieurs modulateurs connus des CYP sur l'ARN messager, l'expression protéique et l'activité du CYP3A6 et de la NPR. Le cytochrome 3A6 chez le lapin est l'équivalent du CYP3A4 chez l'humain, soit l'isoforme le plus couramment impliqué à la biotransformation des médicaments. L'hypothèse de ce projet de recherche est que dû à leur étroite collaboration enzymatique, les cytochromes P450, principalement le CYP3A4, et la NADPH P450 réductase doivent possiblement être régulés par des mécanismes communs.

1. Effets d'activateurs des PPAR γ , PPAR α , HIF-1 et AP-1 sur l'expression et l'activité de la NPR et du CYP3A6.

La rosiglitazone est un médicament de la famille des thiazolidinediones (glitazones) utilisés pour le traitement du diabète non-insulino dépendant. La rosiglitazone augmente la sensibilité à l'insuline en activant les PPAR γ , des récepteurs nucléaires qui modulent la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, et ainsi diminue la glycémie (Lehmann et coll., 1998). *In vitro*, la rosiglitazone inhibe la transcription des CYP2C (Yamazaki et coll., 2000). On a également démontré en utilisant des hépatocytes humains que la rosiglitazone à des doses variant entre 50 et 100 μ M, ainsi que deux autres glitazones, entraînent une augmentation dose-dépendante de l'expression protéique et de l'activité enzymatique des CYP3A4 et CYP2B6 (Sahi et coll., 2003). Ces résultats, suggèrent que *in vitro* les PPAR γ sont impliqués dans la régulation de certaines isoformes du cytochrome P450.

Le fénofibrate, quant à lui, fait partie des dérivés de l'acide fibrique (fibrates) qui agissent en activant de manière spécifique le PPAR α (Chinetti-Gbaguidi et coll., 2005). Le fénofibrate est utilisé cliniquement pour le traitement des dyslipidémies se présentant avec une hypertriglycéridémie en stimulant la lipase lipoprotéique et le catabolisme des VLDL (Rader et Haffner, 1999). Les fibrates peuvent provoquer des interactions médicamenteuses avec certains anticoagulants et antidiabétiques, interactions qui peuvent en grande partie être attribuées à l'induction enzymatique des CYP (Lozada et Dujovne, 1994). En effet, le groupe de Prueksaritanont a démontré *in vitro* qu'à des concentrations supérieures à 50 μ M, le fénofibrate provoque une augmentation de l'ARNm et de

l'activité enzymatique des CYP3A4 et CYP2C8 (Prueksaritanont et coll., 2005). En utilisant un système de gènes rapporteurs et de vecteurs d'expression, ils conclurent également que l'induction enzymatique produite par le fénofibrate n'est pas médiée par l'activation du PXR, laissant croire au rôle potentiel du PPAR α dans la régulation des CYP.

Le HIF-1 est un facteur de transcription impliqué dans l'homéostasie cellulaire de l'oxygène. Sa sous-unité α sensible à l'O₂ lui permet de réagir rapidement aux conditions d'hypoxie, alors que sa sous-unité β demeure constitutivement active. Le AP-1 représente un autre groupe de facteurs de transcription, formé par l'hétérodimérisation de deux protéines de liaison à l'ADN (c-Fos et c-Jun), ce complexe peut activer ou inhiber la transcription de gènes en réponse à plusieurs stimuli comme des cytokines, l'hypoxie ou des facteurs de croissance (Jochum et coll., 2001). L'acétate de plomb employé entre autre dans la fabrication de teintures à cheveux est un activateur de l'AP-1 et le chlorure de cobalt (CoCl₂), utilisé majoritairement dans la préparation de réactifs pour la synthèse organique, est un activateur de HIF-1. Notre laboratoire a démontré la participation de ces deux facteurs de transcriptions, le HIF-1 et l'AP-1, à l'augmentation d'expression protéique du CYP3A6 induite par l'hypoxie chez le lapin (Fradette et du Souich, 2003).

Nous avons d'abord étudié *in vitro* avec des hépatocytes de lapin, l'effet des activateurs des PPAR γ (rosiglitazone), du PPAR α (fénofibrate), du HIF-1 (chlorure de cobalt) et du AP-1 (acétate de plomb) sur l'expression protéique et l'activité enzymatique du CYP3A6. Après 48 heures d'incubation, uniquement la rosiglitazone entraîne une élévation statistiquement significative de l'expression de la protéine du CYP3A6 et le fénofibrate

tend pour sa part à augmenter l'expression ($p > 0,05$); néanmoins, la rosiglitazone et le fénofibrate augmentent l'activité de l'isoforme. Ces résultats suggèrent que les PPAR γ et PPAR α sont impliqués dans la régulation du CYP3A6. Il a été proposé que les agonistes du PPAR α , tel le fénofibrate, pourraient réguler l'expression des CYP via une augmentation d'expression de CAR (Saito et coll., 2010); par ailleurs, il a aussi été proposé que les agonistes pourraient produire directement l'induction des CYP par les PPAR (Savas et coll., 2009). Il est bien connu qu'une fois activés, les PPARs migrent vers le noyau où il se dimérisent avec le récepteur nucléaire RXR pour se fixer aux sites cibles du promoteur de nombreux gènes; parmi ces gènes, un gène de la superfamille du cytochrome P450, le *CYP27A1*, est activé par le dimère PPAR γ /RXR (Quinn et coll., 2005). Il est donc possible que d'autres isoformes du cytochrome P450, en l'occurrence le CYP3A6, puissent être induite par des agonistes des PPARs.

Les expériences consistant à incuber les hépatocytes avec du CoCl₂ ou de l'acétate de plomb n'ont pas réussi à augmenter l'expression ou l'activité du CYP3A6. Ainsi, nos résultats ne confirment pas les observations rapportées par notre laboratoire (Fradette et du Souich, 2003) démontrant que le CoCl₂ et l'acétate de plomb induisent l'expression du CYP3A6 en activant le HIF-1 et l'AP-1. Pour tenter d'expliquer ces résultats apparemment contradictoires, nous pouvons soulever des différences du protocole entre les deux études. Par exemple, Fradette et du Souich ont utilisé des doses de 100 μ M de CoCl₂ et nous 150 μ M; les hépatocytes ont été incubés avec le CoCl₂ et l'acétate de plomb pendant 24 heures, alors que la durée des incubations dans notre étude a été de 48 heures.

Concernant la NPR, aucun des quatre activateurs, rosiglitazone, fénofibrate, CoCl_2 et acétate de plomb, ne modifie l'expression ou l'activité enzymatique de la protéine. Ces résultats suggèrent que les facteurs de transcription $\text{PPAR}\gamma$, $\text{PPAR}\alpha$, HIF-1 et AP-1 ne contribuent pas à la régulation de la NPR.

2. Effets du phénobarbital et de la dexaméthasone sur la NPR après 48 heures d'incubation.

La dexaméthasone est un puissant glucocorticoïde synthétique utilisé dans le traitement anti-inflammatoire et immunosuppresseur d'une variété de pathologies dermatologiques, endocriniennes et néoplasiques. Elle agit en supprimant la migration des neutrophiles, en diminuant la production de médiateurs inflammatoires et en abolissant la réponse immune (Konig et coll., 2006). Comme agoniste des GR, ce stéroïde provoque l'homodimérisation du GR et la migration de ses récepteurs dans le noyau afin de moduler la transcription des gènes cibles. Une fois administrée, la Dexa est métabolisée, majoritairement au niveau du foie par le CYP3A4, puis excrétée dans l'urine par les reins. Fait à noter, elle agit également comme inducteur enzymatique de plusieurs CYP dont les CYP2B6, CYP3A11 et CYP3A4 ce qui peut mener à d'importantes interactions médicamenteuses avec tout médicament métabolisé par ces mêmes isoformes (Wrighton et coll., 1985). Fait intéressant, la Dexa à des concentrations nanoM (<100 nM) n'est pas un inducteur des isoformes du cytochrome P450 (Pascussi et coll., 2000b). Nos résultats confirment qu'à la dose utilisée (100 nM), la Dexa n'induit pas l'expression du CYP3A6. Il a aussi été démontré que la Dexa augmente l'expression de la NPR dans un modèle de souris transgéniques *in vivo* (Schuetz et coll., 2000).

Le phénobarbital (PB) est un barbiturique utilisé depuis de nombreuses années comme antiépileptique, surtout pour le traitement des convulsions tonico-cloniques généralisées (Grand Mal) (Kwan et Brodie, 2004). Le PB possède également des propriétés sédatives et hypnotiques, mais les benzodiazépines demeurent plus utilisées pour ce type d'indication. Le PB est un barbiturique fortement lipophile connu aussi pour provoquer plusieurs effets systémiques, en particulier au niveau du foie (Conney, 1982). La réponse de l'organisme au PB se caractérise par une augmentation du poids hépatique, une prolifération du réticulum endoplasmique et l'induction ou l'inhibition de plusieurs gènes dont deux des CYP (Frueh et coll., 1997). Les premières études concernant les effets du PB sur les CYP ont d'abord démontré une augmentation des transcrits des gènes *CYP2B1*, *CYP2B2* et *CYP2C6* dans des cellules d'hépatome de rat (Corcos et Weiss, 1988). Puis, Luc et ses collaborateurs ont démontré que le PB, ainsi que d'autres barbituriques semblables au PB, induisent une augmentation d'expression de plusieurs CYP tels ceux de la sous-famille CYP2B (Luc et coll., 1996).

Les mécanismes sous jacents à l'induction enzymatique produite par le PB sont relativement bien connus. Pour ce qui est du PB, sa capacité d'induire l'expression des CYP requiert la présence d'une région génomique appelée PBREM – PB-Responsive Enhancer Module (Trottier et coll., 1995). Cette séquence d'ADN qui contient les déterminants principaux de la reconnaissance du phénobarbital permet l'activation transcriptionnelle des gènes CYP. Le PB active CAR et PXR qui suite à la translocation nucléaire se dimérisent avec RXR, et les hétérodimères CAR/RXR et PXR/RXR peuvent tous deux se fixer au PBREM chez l'humain avec une spécificité de liaison comparable (Xie et coll., 2000). Les récepteurs nucléaires CAR et PXR sont essentiels pour permettre

l'induction des CYP en réponse au PB. Par ailleurs, les gènes des CYP possèdent également des sites de liaison pour les hétérodimères contenant les récepteurs nucléaires CAR et PXR, soit les motifs de type DR3, DR4, DR5 et ER6 (Honkakoski et coll., 1998 ; Moore et Kliewer, 2000). La stimulation ligand-dépendante de PXR active la transcription d'éléments de réponse d'hormones retrouvés au niveau des gènes du CYP3A1 chez le rat (Kliewer et coll., 1998) et du CYP3A4 chez l'humain (Lehmann et coll., 1998). Il faut noter que le PB n'est pas un agoniste direct des récepteurs CAR et PXR. L'activation de ces derniers en réponse au barbiturique semble plutôt faire intervenir des protéines kinases et phosphatases dans le but d'induire les gènes CYP (Corcos et Lagadic-Gossmann, 2001).

Bien que les glucocorticoïdes augmentent l'expression de certains gènes via une activation directe et classique des GR, l'induction enzymatique du CYP3A par la Dexa semble relever d'un processus d'activation unique (Schuetz et Guzelian, 1984). En effet, comme mentionné auparavant, à des concentrations nanomolaires qui permettent une activation complète des GR, la Dexa augmente l'expression d'ARNm des récepteurs nucléaires *CAR* et *PXR* (Pascussi et coll., 2000b; Pascussi et coll., 2000c). L'induction de *CAR* et de *PXR* potentialise l'induction du CYP3A4 initiée par le PB (Williams et coll., 2005). À des concentrations micromolaires de Dexa, l'augmentation d'expression du CYP3A et de la NPR est indépendante des GR puisque l'induction est préservée chez des souris knock-out (-/-) pour ce gène (Schuetz et coll., 2000). La réponse cellulaire intégrée implique donc à la fois plusieurs récepteurs nucléaires, les CYP et leurs différents inducteurs.

Dans un premier temps, nous avons étudié les changements d'ARNm, d'expression et d'activité de la NPR en présence de Dexa, de PB et de la combinaison Dexa + PB après 48 heures d'incubation. La Dexa seule induit une augmentation de l'ARNm ainsi que de l'activité de la NPR. Bien que l'expression de la protéine semble également être plus élevée en présence de Dexa seule comparativement aux témoins, cette différence n'est pas statistiquement significative. Le PB augmente l'activité de la NPR sans changements détectables de l'expression de la protéine et provoque une diminution de la quantité d'ARNm de la NPR. Cette réduction de l'ARNm de la NPR observée avec 5 et 10 mM de PB après 48 heures d'incubation pourrait être expliquée par un changement diphasique, c'est-à-dire, le PB augmenterait le ARNm du NPR plus précocement suivie par une diminution tardive, tel que le suggèrent les résultats des expériences réalisées à 2, 4 et 24 heures. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'il a été rapporté que le PB induit l'expression de la NPR dans différents modèles expérimentaux (Vecchini et coll., 1995; Clark et coll., 1996; Zhang et coll., 2000; Schuetz et coll., 2000). Néanmoins, cette hypothèse doit être confirmée avec d'autres études réalisées à différents temps d'incubation avec le PB seul. Enfin, la combinaison Dexa + PB 10 mM augmente l'ARNm, l'expression et l'activité de la NPR.

Nous avons ensuite étudié les effets de la Dexa et de la combinaison Dexa + PB 10 mM sur la NPR après 2, 4, 24 et 48 heures d'incubation. Afin de mieux comprendre les résultats, il faut souligner que dans les hépatocytes témoins, le ARNm du NPR diminue progressivement d'approximativement 75% pour se stabiliser à 24 heures. La Dexa entraîne une élévation de l'ARNm de la NPR précoce et transitoire, ainsi l'induction est observée à 2 heures, différence qui n'est plus statistiquement significative après 4 heures

d'incubation. La Dexa n'augmente ni l'expression ni l'activité de la NPR pendant les premières 24 heures, l'induction de l'expression et de l'activité de la NPR est manifeste après 48 heures d'incubation.

La combinaison Dexa + PB 10 mM provoque de son côté une induction de l'ARNm, de l'expression et de l'activité de la NPR, augmentations plus importantes ($p < 0.05$) que celles obtenues avec la Dexa seule. Par rapport au hépatocytes témoins, l'induction de l'ARNm de la *NPR* par la combinaison Dexa + PB 10 mM s'observe précocement, dès la 2^e heure d'incubation, atteint la valeur maximale à 4 heures, et se maintient pendant 24 heures. En conclusion, ces résultats démontrent que la Dexa est un inducteur de la NPR et que l'induction de l'ARNm est détectée précocement à 2 heures, mais l'induction de la protéine exige 48 heures, même si l'activité de la NPR est déjà augmentée à 24 heures. Nos résultats suggèrent que le PB potentialise l'effet de la Dexa.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec le CYP3A6. Comme observé avec le gène de la *NPR*, l'ARNm du CYP3A6 dans le hépatocytes témoins diminue en fonction du temps, pour à 48 heures être approximativement 10% de la quantité mesuré à 2 heures. L'incubation des hépatocytes avec la Dexa n'empêche pas la diminution de l'ARNm du *CYP3A6*. Par rapport aux hépatocytes témoins, le PB et la combinaison Dexa + PB 5 et 10 mM entraînent d'importantes augmentations des quantités d'ARNm du *CYP3A6*, induction qui est plus importante à 48 heures; c'est-à-dire, l'induction du CYP3A6 par le PB augmente avec le temps. Bien que l'effet inducteur semble augmenté en ajoutant la Dexa, il n'est cependant pas possible de valider une potentialisation de l'induction du CYP3A6 initiée par le PB suite à 48 heures d'incubation. Ces changements d'ARNm, d'expression et d'activité du CYP3A6 ont encore une fois été observés après 2, 4, 24 et

48 heures d'incubation. La Dexa seule n'a aucun effet sur l'ARNm, l'expression et l'activité du CYP3A6, et ce aux différents temps d'incubation. La combinaison Dexa + PB 10 mM augmente l'ARNm du *CYP3A6* dès 2 heures pour se maintenir élevé jusqu'à 48 heures. Ces résultats sont en accord avec l'induction en fonction du temps des ARNm des *CYP3A12* et *CYP3A26* du beagle produite par 1 mM de PB, l'induction maximale qui paraît s'observer à 72 heures (Graham et coll., 2006). En conclusion, comme d'autres auteurs ont rapporté avec des hépatocytes humains ou de rongeur, avec des hépatocytes de lapin, la Dexa à des doses nanomolaires n'induit pas le CYP3A6 et le PB à des doses milimolaires est un puissant inducteur. L'induction du CYP3A6 par le PB est progressive sur plus de 48 heures et différente de l'induction du NPR produite par la Dexa qui est passagère. Notons toutefois que ces résultats expérimentaux obtenus avec de fortes doses *in vitro* peuvent amener certaines limitations dans l'interprétation lorsque comparés aux doses 10 à 100 fois inférieures utilisées en clinique.

Toujours dans l'optique d'étudier la modulation de la NPR, nous avons analysé les effets de la Dexa et du PB sur l'ARNm des récepteurs nucléaires CAR, PXR et RXR α ainsi que sur la *protéine phosphatase 2A*. Suite à 48 heures d'incubation des hépatocytes avec la Dexa, l'ARNm de *CAR* et de *PXR* ont augmenté. Cependant aucun changement des ARNm de *CAR*, *PXR* et *RXR α* est détecté pendant les premières 24 heures d'incubation avec la Dexa. La combinaison Dexa + PB 10 mM induit une élévation de l'ARNm de *CAR*, *PXR* et *RXR α* dès la 2^e heure d'incubation, pour se maintenir pendant 4 heures pour *CAR* et *PXR* et 24 heures pour *RXR*. Ni la Dexa ni le PB ne modifient l'ARNm de la *PP2A*.

Bien qu'une quantité plus élevée totale d'ARNm dans la cellule ne soit pas nécessairement indicateur d'une translocation nucléaire augmentée, ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse que l'activation des récepteurs nucléaires CAR et PXR et l'hétérodimérisation avec le RXR α pourraient contribuer à l'induction de la NPR par la Dexa et le PB. Cependant, les changements en fonction du temps de l'ARNm de la NPR induits par le Dexa et le PB et les changements en fonction du temps des récepteurs nucléaires ne paraît pas confirmer cette hypothèse. Des études additionnelles sont nécessaires pour comprendre le rôle de CAR, PXR et RXR dans l'expression de NPR.

Comme mentionné précédemment, l'activation de CAR et PXR en réponse au PB fait intervenir certaines protéines kinases et phosphatases dans le but d'induire les gènes CYP (Corcos et Lagadic-Gossmann, 2001). Nous avons analysé les effets du PD098059 (PD), un bloqueur de l'activation de MAPK1, et de l'acide okadaïque (OA), un inhibiteur de la PP2A, afin de mieux comprendre comment cette modulation de la NPR et du CYP3A6 s'effectue. Tout d'abord, l'inhibition de l'activation de MAPK1 par le PD prévient l'augmentation d'expression et d'activité de la NPR induite par le PB. De plus, l'OA bloc également l'induction de l'expression et de l'activité de la NPR produite par le PB. Nos résultats suggèrent donc que la déphosphorylation produite par la PP2A dans le cytoplasme et la phosphorylation par la MAPK1 en aval seraient tous deux impliquées dans la modulation de la NPR par le PB.

Pour ce qui est du CYP3A6, l'augmentation d'expression et d'activité du CYP3A6 induite par le PB n'est pas bloquée par l'ajout du PD. La phosphorylation de la MAPK1 n'est donc pas nécessaire à cette induction du CYP3A6 par le barbiturique. À l'inverse, l'OA prévient l'augmentation de l'expression et de l'activité du CYP3A6 induite par le

PB. L'OA, qui à de faibles concentrations nanomolaires inhibe préférentiellement la PP2A (Yoshinari et coll., 2003), empêche la déphosphorylation produite par la PP2A qui est nécessaire pour permettre la translocation de CAR dans le noyau en réponse au PB et bloque ainsi son effet inducteur.

Comme décrit par le groupe de Negishi avec des hépatocytes de souris, le PB provoque la translocation du récepteur nucléaire CAR à l'intérieur du noyau et permet l'induction du CYP2B (Yoshinari et coll., 2003). Chez les souris non-induites par le PB, CAR forme un complexe avec la protéine de choc thermique HSP90 (heat shock protein 90) et est retenu dans le cytoplasme par la co-chaperonne CCRP (cytoplasmic CAR retention protein). En réponse au PB, la protéine phosphatase PP2A est recrutée et la déphosphorylation du complexe permet à CAR de migrer dans le noyau. La figure 45 représente l'hypothèse formulée selon notre étude qui résume la réponse cellulaire responsable de la modulation de la NPR; un modèle qui intègre à la fois l'induction par le PB conjointement à celle par la Dexa et son récepteur.

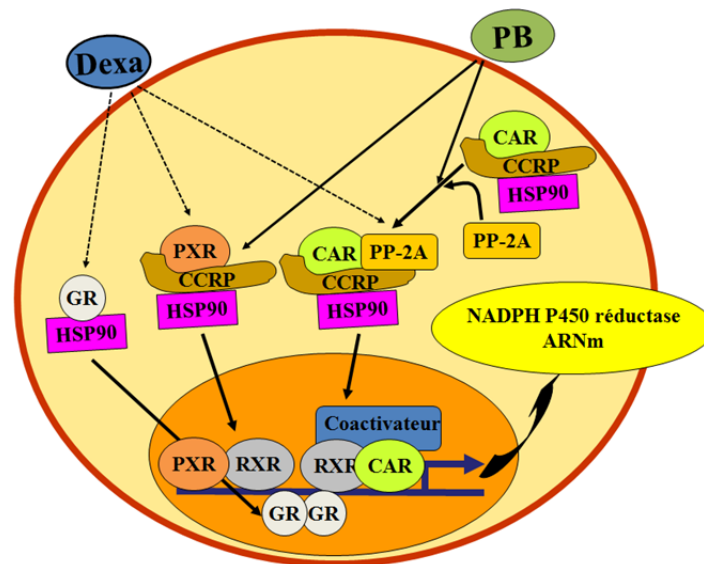


Figure 45. Schéma résumant la réponse cellulaire intégrée responsable de la modulation de la NPR.

Pour terminer, la réaction inflammatoire aseptique provoquée par l'injection de térébenthine diminue l'expression ainsi que l'activité de la NPR et du CYP3A6 de manière statistiquement significative. Nous pouvons spéculer que la diminution de l'activité du CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire est en partie secondaire à la réduction de l'activité de la NPR, mais aussi en partie causée par la diminution de l'expression du CYP3A6.

L'inhibition du CYP2B par les cytokines inflammatoires est dépendante du monoxyde d'azote (NO); celle du CYP3A fait en plus intervenir l'inhibition par des protéasomes (Lee et coll., 2009). Plusieurs études ont également constaté l'implication de différents médiateurs sériques tels INF- γ , TNF- α , IL-6 et IL-1 β dans l'inhibition des CYP en présence d'une réaction inflammatoire (El-Kadi et coll., 1997; Bleau et coll., 2000; Prandota, 2005). La participation des récepteurs nucléaires CAR, PXR et RXR a aussi été observée dans certaines études (Pascussi et coll., 2000b; Beigneux et coll., 2002). Bref, on peut émettre comme hypothèse que tout comme avec les cytochromes, plusieurs composantes cellulaires peuvent contribuer à cet effet d'inhibition de la NPR par la RI. D'autres études supplémentaires seraient cependant nécessaires afin d'étudier plus profondément cette hypothèse.

E. Bibliographie

Allain P (2000). Les médicaments, CdM Éditions, 3e édition.

Arakrama, C., Clive R. T (2005). "Part A. General Pathology, Section II." The Host Response to Injury, Chapter 3. The Acute Inflammatory Response, sub-section Cardinal Clinical Signs. Concise Pathology. 3rd edition.

Audet-Walsh, E. et A. Anderson (2009). "Dexamethasone induction of murine CYP2B genes requires the glucocorticoid receptor." Drug Metab Dispos **37**(3): 580-588.

Axelrod, J. (1955). "The enzymatic demethylation of ephedrine." J Pharmacol Exp Ther **114**(4): 430-438.

Backes, W. L (1993). "NADPH-cytochrome P450 reductase function." Dans: Cytochrome P450, Shenkman J. B. et Greim H. ed. : 15-34.

Baes, M., T. Gulick, et al. (1994). "A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements." Mol Cell Biol **14**(3): 1544-1552.

Bainton, F. D (1999). "Developmental Biology of Neutrophils and Eosinophils." Dans: INFLAMMATION Basic and Principles Clinical Correlates, Gallin John I et Snyderman Ralph ed., troisième édition p. 13-34.

Baumann, H. et J. Gauldie (1994). "The acute phase response." Immunol Today **15**(2): 74-80.

Beigneux, A. P., A. H. Moser, et al. (2002). "Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 145-149.

Beigneux, A. P., A. H. Moser, et al. (2003). "Sick euthyroid syndrome is associated with decreased TR expression and DNA binding in mouse liver." Am J Physiol Endocrinol Metab **284**(1): E228-236.

Berger, J. et D. E. Moller (2002). "The mechanisms of action of PPARs." Annu Rev Med **53**: 409-435.

Berra, E., D. E. Richard, et al. (2001). "HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation." FEBS Lett **491**(1-2): 85-90.

Bhargava, A., W. B. Jackson, et al. (1998). "Ocular allergic disease." Drugs Today (Barc) **34**(11): 957-971.

Black, S. D., J. S. French, et al. (1979). "Role of a hydrophobic polypeptide in the N-terminal region of NADPH-cytochrome P-450 reductase in complex formation with P-450LM." Biochem Biophys Res Commun **91**(4): 1528-1535.

Bleau, A. M., M. C. Levitchi, et al. (2000). "Cytochrome P450 inactivation by serum from humans with a viral infection and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammation: the role of cytokines." Br J Pharmacol **130**(8): 1777-1784.

Bleau, A. M., P. Maurel, et al. (2003). "Interleukin-1beta, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1, 1A2 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes." Eur J Pharmacol **473**(2-3): 197-206.

Brodie, B. B., J. Axelrod, et al. (1955). "Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes." Science **121**(3147): 603-604.

Buzkova, H., K. Pechandova, et al. (2006). "Genetic polymorphism of cytochrome P450 and methods for its determination." Prague Med Rep **107**(4): 383-393.

Caldwell, J. (2004). "Pharmacogenetics and individual variation in the range of amino acid adequacy: the biological aspects." J Nutr **134**(6 Suppl): 1600S-1604S; discussion 1630S-1632S, 1667S-1672S.

Carnahan, V. E. et M. R. Redinbo (2005). "Structure and function of the human nuclear xenobiotic receptor PXR." Curr Drug Metab **6**(4): 357-367.

Celander, M., R. Weisbrod, et al. (1997). "Glucocorticoid potentiation of cytochrome P4501A1 induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in porcine and human endothelial cells in culture." Biochem Biophys Res Commun **232**(3): 749-753.

Chang, G. W. et P. C. Kam (1999). "The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes." Anaesthesia **54**(1): 42-50.

Chang, K. C., T. D. Bell, et al. (1978). "Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness." Lancet **1**(8074): 1132-1133.

Chast, F (2002). "Histoire contemporaine des médicaments". Paris : La Découverte.

Chauret, N., N. Tremblay, et al. (1999). "Description of a 96-well plate assay to measure cytochrome P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe." Anal Biochem **276**(2): 215-226.

Chinetti-Gbaguidi, G., J. C. Fruchart, et al. (2005). "Pleiotropic effects of fibrates." Curr Atheroscler Rep **7**(5): 396-401.

Clark M.A., Williams J.F., et al. (1996). "Effects of phenobarbital and interleukin-6 on cytochrome P4502B1 and 2B2 in cultured rat hepatocytes." Biochem Pharmacol. **51**(5):701-6.

Clark W. C (1976). "The environment and the genotype in polymorphism". Zool. J. Linn. **58** :255–262.

Conney, A. H. (1982). "Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture." Cancer Res **42**(12): 4875-4917.

Corcos, L. et D. Lagadic-Gossmann (2001). "Gene induction by Phenobarbital: an update on an old question that receives key novel answers." Pharmacol Toxicol **89**(3): 113-122.

Corcos, L. et M. C. Weiss (1988). "Phenobarbital, dexamethasone and benzanthracene induce several cytochrome P450 mRNAs in rat hepatoma cells." FEBS Lett **233**(1): 37-40.

Corcos C, Brey J, et al (2002). "Les récepteurs nucléaires CAR et PXR contrôlent l'induction des cytochromes P450 par le phénobarbital." Medecines/Sciences **18**: 429-37.

Correia, M. A. (1991). "Cytochrome P450 turnover." Methods Enzymol **206**: 315-325.

Cupp, M. J. and T. S. Tracy (1998). "Cytochrome P450: new nomenclature and clinical implications." Am Fam Physician **57**(1): 107-116.

Delloye-Bourgeois, C., E. Brambilla, et al. (2009). "Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer." J Natl Cancer Inst **101**(4): 237-247.

Dulak, J. et A. Jozkowicz (2003). "Carbon monoxide -- a "new" gaseous modulator of gene expression." Acta Biochim Pol **50**(1): 31-47.

Dumais, G., Iovu, M., et al (2008). "Inflammatory reactions and drug response: importance of cytochrome P450 and membrane transporters. Expert Rev." Clin. Pharmacol. **1**(5), 627-647.

Elbekai, R. H. et A. O. El-Kadi (2006). "Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease." Pharmacol Ther **112**(2): 564-587.

Elin, R. J., E. S. Vesell, et al. (1975). "Effects of etiocholanolone-induced fever on plasma antipyrine half-lives and metabolic clearance." Clin Pharmacol Ther **17**(4): 447-457.

El-Kadi, A. O., H. Maurice, et al. (1997). "Down-regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of mediators in human and animal serum and in the liver." Br J Pharmacol **121**(6): 1164-1170.

Estabrook, R. W., M. R. Franklin, et al. (1971). "Biochemical and genetic factors influencing drug metabolism. Influence of hepatic microsomal mixed function oxidation reactions on cellular metabolic control." Metabolism **20**(2): 187-199.

Fernandez, G., M. C. Villarruel, et al. (1982). "Covalent binding of carbon tetrachloride metabolites to the heme moiety of cytochrome P-450 and its degradation products." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **35**(2): 283-290.

- Fluck, C. E., T. Tajima, et al. (2004). "Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome." Nat Genet **36**(3): 228-230.
- Fontana, E., P. M. Dansette, et al. (2005). "Cytochrome p450 enzymes mechanism based inhibitors: common sub-structures and reactivity." Curr Drug Metab **6**(5): 413-454.
- Forman, B. M., I. Tzamelis, et al. (1998). "Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta." Nature **395**(6702): 612-615.
- Fradette, C. et P. du Souich (2003). "Hypoxia-inducible factor-1 and activator protein-1 modulate the upregulation of CYP3A6 induced by hypoxia." Br J Pharmacol **140**(6): 1146-1154.
- Frank, D., U. Jaehde, et al. (2007). "Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping." Eur J Clin Pharmacol **63**(4): 321-333.
- Franklin, M. R (1997). "Inhibition of mixed-function oxidations by substrates forming reduced cytochrome P450 metabolic-intermediate complexes." Pharmacol. Ther. A. **2**: 227-245.
- Frueh, F. W., U. M. Zanger, et al. (1997). "Extent and character of phenobarbital-mediated changes in gene expression in the liver." Mol Pharmacol **51**(3): 363-369.
- Fujiwara, N. et K. Kobayashi (2005). "Macrophages in inflammation." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **4**(3): 281-286.
- Furze, R. C. et S. M. Rankin (2008). "Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow." Immunology **125**(3): 281-288.
- Goldsby, R. A., Kindt T. J., et al (2001). "Migration des leucocytes et inflammation." Immunologie le cours de Janys Kuby. p. 371-393.
- Gonzalez, F. J. et C. B. Kasper (1980). "Phenobarbital induction of NADPH-cytochrome c (P-450) oxidoreductase messenger ribonucleic acid." Biochemistry **19**(9): 1790-1796.
- Gozal, E., N. Simakajornboon, et al. (1999). "Hypoxia induces selective SAPK/JNK-2-AP-1 pathway activation in the nucleus tractus solitarius of the conscious rat." J Neurochem **73**(2): 665-674.
- Graham R.A., Tyler L.O., et al. (2006). "Temporal kinetics and concentration-response relationships for induction of CYP1A, CYP2B, and CYP3A in primary cultures of beagle dog hepatocytes." J Biochem Mol Toxicol. **20**(2):69-78.
- Gu, J., Y. Weng, et al. (2003). "Liver-specific deletion of the NADPH-cytochrome P450 reductase gene: impact on plasma cholesterol homeostasis and the function and regulation of microsomal cytochrome P450 and heme oxygenase." J Biol Chem **278**(28): 25895-25901.

Guengerich, F. P. (2002). "Rate-limiting steps in cytochrome P450 catalysis." Biol Chem **383**(10): 1553-1564.

Guengerich, F. P. (2003). "Cytochromes P450, drugs, and diseases." Mol Interv **3**(4): 194-204.

Guengerich, F. P. (2007). "Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview." J Biochem Mol Toxicol **21**(4): 163-168.

Haas E, Horecker BL, et al (1940). "The enzymatic reduction of cytochrome c." J. Biol. Chem **136**: 747-774.

Hogan, S. P., H. F. Rosenberg, et al. (2008). "Eosinophils: biological properties and role in health and disease." Clin Exp Allergy **38**(5): 709-750.

Hong, C. C., B. K. Tang, et al. (2004). "Cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) activity and risk factors for breast cancer: a cross-sectional study." Breast Cancer Res **6**(4): R352-365.

Honkakoski, P. et M. Negishi (1998). "Protein serine/threonine phosphatase inhibitors suppress phenobarbital-induced Cyp2b10 gene transcription in mouse primary hepatocytes." Biochem J **330** (Pt 2): 889-895.

Honkakoski, P., I. Zelko, et al. (1998). "The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene." Mol Cell Biol **18**(10): 5652-5658.

Horecker, B. L (1950). "Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase in liver." J Biol Chem **183**:593-605.

Huang, N., A. V. Pandey, et al. (2005). "Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis." Am J Hum Genet **76**(5): 729-749.

Iber, H., Q. Chen, et al. (2000). "Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukin-1 mediated by NF-kappaB binding at the transcription start site." Arch Biochem Biophys **377**(1): 187-194.

Inano, H. et B. Tamaoki (1985). "The presence of essential carboxyl group for binding of cytochrome c in rat hepatic NADPH-cytochrome P-450 reductase by the reaction with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide." J Enzyme Inhib **1**(1): 47-59.

Ingelman-Sundberg, M., S. C. Sim, et al. (2007). "Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects." Pharmacol Ther **116**(3): 496-526.

- Iyanagi, T. et H. S. Mason (1973). "Some properties of hepatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase." Biochemistry **12**(12): 2297-2308.
- Jochum, W., E. Passegue, et al. (2001). "AP-1 in mouse development and tumorigenesis." Oncogene **20**(19): 2401-2412.
- Jurk, K. et B. E. Kehrel (2005). "Platelets: physiology and biochemistry." Semin Thromb Hemost **31**(4): 381-392.
- Katzung B. G (2004). Basic & Clinical Pharmacology, 9e edition.
- Kawamoto, T., T. Sueyoshi, et al. (1999). "Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene." Mol Cell Biol **19**(9): 6318-6322.
- Kliwer, S. A., B. Goodwin, et al. (2002). "The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism." Endocr Rev **23**(5): 687-702.
- Kliwer, S. A., J. T. Moore, et al. (1998). "An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway." Cell **92**(1): 73-82.
- Klingenberg, M. (1958). "Pigments of rat liver microsomes." Arch Biochem Biophys **75**(2): 376-386.
- Koike, C., R. Moore, et al. (2007). "Extracellular signal-regulated kinase is an endogenous signal retaining the nuclear constitutive active/androstane receptor (CAR) in the cytoplasm of mouse primary hepatocytes." Mol Pharmacol **71**(5): 1217-1221.
- Konig, T., H. J. Schuberth, et al. (2006). "Dexamethasone depresses the expression of L-selectin but not the in vivo migration of bovine neutrophils into the uterus." Theriogenology **65**(7): 1227-1241.
- Konig, T., H. J. Schuberth, et al. (2006). "Dexamethasone depresses the expression of L-selectin but not the in vivo migration of bovine neutrophils into the uterus." Theriogenology **65**(7): 1227-1241.
- Kupfer, A. et R. Preisig (1984). "Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man." Eur J Clin Pharmacol **26**(6): 753-759.
- Kwan, P. and M. J. Brodie (2004). "Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21st century: a critical review." Epilepsia **45**(9): 1141-1149.
- Landi, M. T., R. Sinha, et al. (1999). "Human cytochrome P4501A2." IARC Sci Publ(148): 173-195.

Laroux, F. S. (2004). "Mechanisms of inflammation: the good, the bad and the ugly." Front Biosci **9**: 3156-3162.

Laybourn, C., P. Tonnesen, et al. (1986). "Pulmonary disease and antipyrine clearance." Clin Pharmacol Ther **40**(4): 415-419.

Lee C.M., Pohl J., et al. (2009) "Duel mechanisms of CYP3A protein regulation by proinflammatory cytokine stimulation in primary hepatocytes cultures." Drug Metab Dispos. **37**(4): 865-872.

Lehmann, J. M., D. D. McKee, et al. (1998). "The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions." J Clin Invest **102**(5): 1016-1023.

Li, H. C., D. Liu, et al. (2001). "Transcriptional induction of hepatic NADPH: cytochrome P450 oxidoreductase by thyroid hormone." Mol Pharmacol **59**(5): 987-995.

Limdi, N. A. et D. L. Veenstra (2008). "Warfarin pharmacogenetics." Pharmacotherapy **28**(9): 1084-1097.

Lin, J. H. et A. Y. Lu (1998). "Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications." Clin Pharmacokinet **35**(5): 361-390.

Lozada, A. et C. A. Dujovne (1994). "Drug interactions with fibric acids." Pharmacol Ther **63**(2): 163-176.

Lu, A. Y. et M. J. Coon (1968). "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.

Lu, N. Z., S. E. Wardell, et al. (2006). "International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors." Pharmacol Rev **58**(4): 782-797.

Luc, P. V., M. Adesnik, et al. (1996). "Transcriptional regulation of the CYP2B1 and CYP2B2 genes by C/EBP-related proteins." Biochem Pharmacol **51**(3): 345-356.

Luoma, P. V., E. A. Sotaniemi, et al. (1983). "Inverse relationship of serum LDL cholesterol and the LDL/HDL cholesterol ratio to liver microsomal enzyme induction in man." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **42**(1): 173-176.

Lynch, T. et A. Price (2007). "The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects." Am Fam Physician **76**(3): 391-396.

- Ma, X., J. R. Idle, et al. (2008). "The pregnane X receptor: from bench to bedside." Expert Opin Drug Metab Toxicol **4**(7): 895-908.
- Masters, B. S. S., Williams, C. H. et al (1967). "The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver." Methods in Enzymology **10**: 565-573.
- Michalets, E. L. (1998). "Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions." Pharmacotherapy **18**(1): 84-112.
- Michalik, L., J. Auwerx, et al. (2006). "International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors." Pharmacol Rev **58**(4): 726-741.
- Miller, G. E., M. A. Zemaitis, et al. (1983). "Mechanisms of diethyldithiocarbamate-induced loss of cytochrome P-450 from rat liver." Biochem Pharmacol **32**(16): 2433-2442.
- Minamiyama, Y., S. Takemura, et al. (1998). "[Inhibition of cytochrome P450 by nitric oxide]." Nippon Yakurigaku Zasshi **112**(1): 33-41.
- Miners, J. O. et D. J. Birkett (1998). "Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism." Br J Clin Pharmacol **45**(6): 525-538.
- Mitre, E. et T. B. Nutman (2006). "Basophils, basophilia and helminth infections." Chem Immunol Allergy **90**: 141-156.
- Moore, J. T. et S. A. Kliewer (2000). "Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions." Toxicology **153**(1-3): 1-10.
- Morgan, E. T. (1989). "Suppression of constitutive cytochrome P-450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxin." Mol Pharmacol **36**(5): 699-707.
- Nadler, S. G. et H. W. Strobel (1991). "Identification and characterization of an NADPH-cytochrome P450 reductase derived peptide involved in binding to cytochrome P450." Arch Biochem Biophys **290**(2): 277-284.
- Nelson, D. R., Koymans L., et al. (1996). "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." Pharmacogenetics **6**(1): 1-42.
- Nelson, D. R., Lehninger A., L., et al (2005). "Lehninger principles of biochemistry." New York: W.H. Freeman. pp. 148.
- Ogawa, Y. et W. J. Calhoun (2006). "The role of leukotrienes in airway inflammation." J Allergy Clin Immunol **118**(4): 789-798; quiz 799-800.

O'Leary, K. A., H. C. Li, et al. (1997). "Thyroid regulation of NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase: identification of a thyroid-responsive element in the 5'-flank of the oxidoreductase gene." Mol Pharmacol **52**(1): 46-53.

Omura, T. et R. Sato (1964). "The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature." J Biol Chem **239**: 2370-2378.

Opdenakker, G. (2001). "New insights in the regulation of leukocytosis and the role played by leukocytes in septic shock." Verh K Acad Geneeskd Belg **63**(6): 531-538; discussion 538-541.

Paine M.J.I., Scrutton N.S., et al (2005). "Electron Transfer Partners of Cytochrome P450." Dans: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Ortiz de Montellano éditeur: 115-148.

Parkington, H. C., H. A. Coleman, et al. (2004). "Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization." Pharmacol Res **49**(6): 509-514.

Parkinson, A (1995). Casarett and Doull's Toxicology, 5th edition.

Parkinson, A (1996). *Casarett & Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons*. 5th edition, Chapter 6.

Pascussi, J. M., L. Drocourt, et al. (2000b). "Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators." Mol Pharmacol **58**(2): 361-372.

Pascussi, J. M., S. Gerbal-Chaloin, et al. (2000c). "Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation." Mol Pharmacol **58**(6): 1441-1450.

Pascussi, J. M., S. Gerbal-Chaloin, et al. (2000a). "Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes." Biochem Biophys Res Commun **274**(3): 707-713.

Phillips, A. H. et R. G. Langdon (1962). "Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies." J Biol Chem **237**: 2652-2660.

Pikuleva, I. A. (2006). "Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis." Pharmacol Ther **112**(3): 761-773.

Pilotto, A., D. Seripa, et al. (2007). "Genetic susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drug-related gastroduodenal bleeding: role of cytochrome P450 2C9 polymorphisms." Gastroenterology **133**(2): 465-471.

Plytycz, B. et R. Seljelid (2003). "From inflammation to sickness: historical perspective." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **51**(2): 105-109.

Porth, C (2007). "Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states." Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 270.

Poulos, T. L. (2005). "Intermediates in P450 catalysis." Philos Transact A Math Phys Eng Sci **363**(1829): 793-806; discussion 1035-1040.

Powell, J. R., S. Vozeh, et al. (1978). "Theophylline disposition in acutely ill hospitalized patients. The effect of smoking, heart failure, severe airway obstruction, and pneumonia." Am Rev Respir Dis **118**(2): 229-238.

Prandota, J. (2005). "Important role of proinflammatory cytokines/other endogenous substances in drug-induced hepatotoxicity: depression of drug metabolism during infections/inflammation states, and genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes/cytokines may markedly contribute to this pathology." Am J Ther **12**(3): 254-261.

Pratt, W. B., Y. Morishima, et al. (2006). "Chaperoning of glucocorticoid receptors." Handb Exp Pharmacol(172): 111-138.

Prueksaritanont, T., K. M. Richards, et al. (2005). "Comparative effects of fibrates on drug metabolizing enzymes in human hepatocytes." Pharm Res **22**(1): 71-78.

Quinn CM., Jessup W., et al. (2005). "Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARgamma ligands." Biochem J. **385**(Pt 3):823-30.

Rader, D. J. et S. M. Haffner (1999). "Role of fibrates in the management of hypertriglyceridemia." Am J Cardiol **83**(9B): 30F-35F.

Rang H.P., Dale M.M., et al (2003). Textbook of pharmacology, Section 2: Chemical mediators: 231-243.

Renton, K. W. (2001). "Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation." Pharmacol Ther **92**(2-3): 147-163.

Sahi, J., C. B. Black, et al. (2003). "Comparative effects of thiazolidinediones on in vitro P450 enzyme induction and inhibition." Drug Metab Dispos **31**(4): 439-446.

Saito, K., K. Kobayashi, et al. (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonists induce constitutive androstane receptor (CAR) and cytochrome P450 2B in rat primary hepatocytes." Drug Metab Pharmacokinet **25**(1): 108-111.

Salnikow, K., T. Kluz, et al. (2002). "The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia." Mol Cell Biol **22**(6): 1734-1741.

Sato, A. et T. Nakajima (1979). "Dose-dependent metabolic interaction between benzene and toluene in vivo and in vitro." Toxicol Appl Pharmacol **48**(2): 249-256.

Savas, U., D. E. Macheimer, et al. (2009). "Opposing roles of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and growth hormone in the regulation of CYP4A11 expression in a transgenic mouse model." J Biol Chem **284**(24): 16541-16552.

Schoonjans, K., B. Staels, et al. (1996). "The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation." Biochim Biophys Acta **1302**(2): 93-109.

Schuetz, E. G. et P. S. Guzelian (1984). "Induction of cytochrome P-450 by glucocorticoids in rat liver. II. Evidence that glucocorticoids regulate induction of cytochrome P-450 by a nonclassical receptor mechanism." J Biol Chem **259**(3): 2007-2012.

Schuetz, E. G., W. Schmid, et al. (2000). "The glucocorticoid receptor is essential for induction of cytochrome P-4502B by steroids but not for drug or steroid induction of CYP3A or P-450 reductase in mouse liver." Drug Metab Dispos **28**(3): 268-278.

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

Semenza, G. L. (2000). "HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia." J Appl Physiol **88**(4): 1474-1480.

Semenza, G. L. et G. L. Wang (1992). "A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation." Mol Cell Biol **12**(12): 5447-5454.

Sewerynek, E., M. Abe, et al. (1995). "Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals." J Cell Biochem **58**(4): 436-444.

Shen, A. L., K. A. O'Leary, et al. (2002). "Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase." J Biol Chem **277**(8): 6536-6541.

Sonne, J., M. Dossing, et al. (1985). "Antipyrine clearance in pneumonia." Clin Pharmacol Ther **37**(6): 701-704.

Sriskandan, S. et D. M. Altmann (2008). "The immunology of sepsis." J Pathol **214**(2): 211-223.

Steinberg, D., S. Parthasarathy, et al. (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." N Engl J Med **320**(14): 915-924.

Sueyoshi, T. et M. Negishi (2001). "Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 123-143.

Swales, K. et M. Negishi (2004). "CAR, driving into the future." Mol Endocrinol **18**(7): 1589-1598.

Takahashi, K., Y. Akiba, et al. (1997). "Effect of dietary ascorbic acid on the hepatic microsomal mixed function oxidase system in liver of chicks treated with Escherichia coli lipopolysaccharide." Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol **118**(3): 301-304.

Tamasi, V., P. Juvan, et al. (2009). "Transcriptional activation of PPARalpha by phenobarbital in the absence of CAR and PXR." Mol Pharm **6**(5): 1573-1581.

Testa, B. et P. Jenner (1981). "Inhibitors of Cytochrome P-450s and their mechanism of action." Drug Metab Rev **12**(1): 1-117.

Tinel, M., J. Elkahwaji, et al. (1999). "Interleukin-2 overexpresses c-myc and down-regulates cytochrome P-450 in rat hepatocytes." J Pharmacol Exp Ther **289**(2): 649-655.

Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications." Vascul Pharmacol **45**(1): 19-28.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Trottier, E., Belzil, A., et al (1995). "Localization of a Phenobarbital-responsive element (PRE) in the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene." Gene **158**: 263-8.

van der Weide, J. et L. S. Steijns (1999). "Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology." Ann Clin Biochem **36** (Pt 6): 722-729.

Vecchini F., Mace K., et al. (1995). "Constitutive and inducible expression of drug metabolizing enzymes in cultured human keratinocytes." Br J Dermatol. **132**(1):14-21.

- Vermilion, J. L., D. P. Ballou, et al. (1981). "Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase." J Biol Chem **256**(1): 266-277.
- Vozech, S., J. R. Powell, et al. (1978). "Changes in theophylline clearance during acute illness." JAMA **240**(17): 1882-1884.
- Wang, J. F., C. C. Zhang, et al. (2009). "Structure of cytochrome p450s and personalized drug." Curr Med Chem **16**(2): 232-244.
- Wang, M., D. L. Roberts, et al. (1997). "Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8411-8416.
- Watkins, R. E., G. B. Wisely, et al. (2001). "The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity." Science **292**(5525): 2329-2333.
- Werck-Reichhart, D. et R. Feyereisen (2000). "Cytochromes P450: a success story." Genome Biol **1**(6): REVIEWS3003.
- Wijnen, P. A., R. A. Op den Buijsch, et al. (2007). "Review article: The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms." Aliment Pharmacol Ther **26 Suppl 2**: 211-219.
- Williams, C. H., Jr. et H. Kamin (1962). "Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver." J Biol Chem **237**: 587-595.
- Williams, S. N., Dunham E. et al (2005). "Induction of Cytochrome P450 Enzymes." Dans: Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry., 3e édition, P.R. Ortiz de Montellano : 323-346.
- Wrighton, S. A., E. G. Schuetz, et al. (1985). "Demonstration in multiple species of inducible hepatic cytochromes P-450 and their mRNAs related to the glucocorticoid-inducible cytochrome P-450 of the rat." Mol Pharmacol **28**(3): 312-321.
- Xie, W., J. L. Barwick, et al. (2000). "Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR." Genes Dev **14**(23): 3014-3023.
- Xu, H. E., M. H. Lambert, et al. (1999). "Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors." Mol Cell **3**(3): 397-403.
- Yamazaki, H., M. Nakano, et al. (1996). "Roles of cytochrome b5 in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes." Arch Biochem Biophys **325**(2): 174-182.

Yamazaki, H., M. Suzuki, et al. (2000). "In vitro inhibitory effects of troglitazone and its metabolites on drug oxidation activities of human cytochrome P450 enzymes: comparison with pioglitazone and rosiglitazone." Xenobiotica **30**(1): 61-70.

Yasukochi, Y. et B. S. Masters (1976). "Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c(cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography." J Biol Chem **251**(17): 5337-5344.

Yoshinari, K., K. Kobayashi, et al. (2003). "Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital." FEBS Lett **548**(1-3): 17-20.

Yu, A. M., J. R. Idle, et al. (2004). "Polymorphic cytochrome P450 2D6: humanized mouse model and endogenous substrates." Drug Metab Rev **36**(2): 243-277.

Zangar, R. C., D. R. Davydov, et al. (2004). "Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450." Toxicol Appl Pharmacol **199**(3): 316-331.

Zelko, I. et M. Negishi (2000). "Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes." Biochem Biophys Res Commun **277**(1): 1-6.

Zhang J., Falany J.L., et al. (2000). "Induction of rat hepatic drug metabolizing enzymes by dimethylcyclosiloxanes." Chem Biol Interact. **124**(2):133-47.

Zhang, Z. Y. et L. S. Kaminsky (1995). "Characterization of human cytochromes P450 involved in theophylline 8-hydroxylation." Biochem Pharmacol **50**(2): 205-211.

Zwillich, C. W., F. D. Sutton, et al. (1975). "Theophylline-induced seizures in adults. Correlation with serum concentrations." Ann Intern Med **82**(6): 784-787.