

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Étude de la modulation de l'activité et de
l'expression de la NADPH-réductase par la
réaction inflammatoire**

Par
Mariève Dupuis

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

Décembre 2007

© Mariève Dupuis, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de la modulation de l'activité et de
l'expression de la NADPH-réductase par la
réaction inflammatoire**

Présenté par :
Mariève Dupuis

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Maja Krajinovic
Président-rapporteur

Dr Patrick du Souich
Directeur de recherche

Dr Denis deBlois
Membre du jury

RÉSUMÉ

Les enzymes du cytochrome P450 (CYP) sont essentiels pour la biotransformation des médicaments. L'activité catalytique des CYP nécessite l'apport d'électrons provenant de la NADPH-réductase. Lors du cycle catalytique des CYP le transfert d'électron est une étape limitante parce que la quantité de NADPH-réductase est restreinte par rapport à la quantité des CYP. La réaction inflammatoire aiguë induite par l'injection de térébenthine diminue l'activité et l'expression du CYP3A6. La diminution d'activité du CYP3A6 ne peut être causée qu'en partie par la diminution d'expression de la protéine. Un changement post-transcriptionnel serait aussi à l'origine de la diminution d'activité du CYP3A6 ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse que la réaction inflammatoire diminue l'activité de la NADPH-réductase affectant aussi l'activité du CYP3A6. Afin d'étudier l'impact de la diminution de l'activité de la NADPH-réductase sur l'activité du CYP3A6, nous avons mesuré l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapin ayant une réaction inflammatoire et des hépatocytes de lapins contrôles en présence de cytokines (IL-1 β , IL-6, IFN- γ et TNF- α), de monoxyde d'azote et de peroxyde d'hydrogène.

L'activité et l'expression de la NADPH-réductase sont diminuées par la réaction inflammatoire produite *in-vivo*. L'IL-6 et l'IL-1 β diminuent aussi l'activité et l'expression de la NADPH-réductase. Le monoxyde d'azote ainsi que le peroxyde d'hydrogène affectent négativement l'activité de la NADPH-réductase. L'ensemble des facteurs qui diminuent l'activité de la NADPH-réductase réduisent en parallèle

l'activité du CYP3A6. Afin d'étudier la modulation de l'activité de la NADPH-réductase, nous avons aussi mesuré son activité en présence d'inhibiteurs de protéines phosphatases ainsi que d'inhibiteurs de protéines kinases.

L'inhibition de la p38 MAPK ne change pas l'activité de la NADPH-réductase et n'est pas impliquée dans la diminution de l'activité de la NADPH-réductase par l'IL-6. Les voies du PI₃K, des ERK1/2 et de JAK/STAT ainsi que le facteur de transcription NF-κB sont nécessaires à l'activité de base de la NADPH-réductase. Lorsque l'on inhibe les protéines phosphatases, nous observons une diminution de l'activité de la NADPH-réductase, de même qu'une réduction de l'activité du CYP3A6. Le pyrrolidine dithiocarbamate diminue l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6, effet qui est additif à la diminution de l'activité produite par les inhibiteurs des protéines phosphatases.

L'expression du CYP3A6 augmente en présence de calyculine A. L'inhibition de la ERK 1/2 par le PD098059 empêche l'augmentation d'expression du CYP3A6 par la calyculine A, suggérant que la voie des ERK 1/2 serait nécessaire à l'augmentation de l'expression du CYP3A6 par la calyculine A.

Mots clés: NADPH-réductase, cytochrome P450, CYP3A6, réaction inflammatoire, IL-6, IL-1β, peroxyde d'hydrogène, monoxyde d'azote, p38 MAPK, ERK 1/2

ABSTRACT

The enzymes of cytochrome P450 (CYP) are essential for drugs biotransformation. The catalytic activity of the CYP requires electrons transferred by the NADPH-reductase. The electron transfer during CYP's catalytic cycle is a limiting step because of the small amount of NADPH-reductase present in the cells by reference to the amounts of CYP. An acute inflammatory reaction induced by the injection of turpentine decreases CYP3A6 activity and expression. The magnitude of the decrease in CYP3A6 activity cannot be explained simply by the decrease in protein expression. A post-transcriptional change contributes to the decrease of CYP3A6 activity during inflammatory reaction. We hypothesized that an acute inflammatory reaction decreases CYP3A6 activity in part by decreasing NADPH-reductase activity. In order to determine the effect of NADPH-reductase activity reduction on CYP3A6 activity, we measured their activity in hepatocytes harvested from rabbit with an inflammatory reaction, in hepatocytes from control rabbits and in hepatocytes incubated with cytokines (IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α), nitric oxide and hydrogen peroxide.

NADPH-reductase activity is decreased by an *in-vivo* acute inflammatory reaction. The incubation of IL-6 and IL-1 β also decreased NADPH-reductase activity and expression. Nitric oxide and hydrogen peroxide affected negatively NADPH-reductase activity. All the factors that affect NADPH-reductase activity decrease in parallel CYP3A6 activity.

In order to study the regulation of NADPH-reductase activity, we measured NADPH-reductase activity in hepatocytes incubated with protein phosphatase and protein kinase inhibitors.

The inhibition of p38 MAPK by SB203580 does not affect NADPH-reductase activity and is not implicated in the down regulation of NADPH-reductase activity by IL-6. The inhibition of proteins phosphatases produced a decrease in NADPH-reductase activity as well as a decrease of CYP3A6 activity. Pyrrolidine dithiocarbamate decreased NADPH-reductase and CYP3A6 activities. In addition to the decrease of NADPH-reductase and CYP3A6 basal activity, pyrrolidine dithiocarbamate produced an additive effect on the decrease of the enzymes activities elicited by the inhibition of proteins phosphatases serine-threonine.

Calyculine A up-regulated the expression of CYP3A6. The inhibition of ERK 1/2 by PD098059 suppressed the increase in expression of CYP3A6 triggered by calyculine A, suggesting that ERK 1/2 pathway is essential for the up-regulation of CYP3A6 by calyculine A.

Keywords: NADPH-reductase, cytochrome P450, CYP3A6, inflammatory reaction, IL-6, IL-1 β , hydrogen peroxide, nitric oxide, p38 MAPK, ERK 1/2

Table des matières

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	v
TABLES DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	xvi
REMERCIEMENTS	xix
A. INTRODUCTION	1
1. LE CYTOCHROME P450	2
1.1 HISTORIQUE DU CYTOCHROME P450	2
1.2 NOMENCLATURE DES CYP	3
1.3 STRUCTURE DES CYP	4
1.4 FONCTIONS DES CYP : SUBSTRATS EXOGÈNES	5
1.4.1 <i>Fonctions des enzymes de la famille CYP1</i>	10
1.4.2 <i>Fonctions des enzymes de la famille CYP2</i>	10
1.4.3 <i>Fonctions des enzymes de la famille CYP3</i>	12
1.5 GÉNÉTIQUE	14
1.6 FONCTIONS DES CYP : SUBSTRATS ENDOGÈNES	15
1.6.1 <i>Métabolisme du Cholestérol</i>	16
1.6.2 <i>Synthèse des acides biliaires</i>	17
1.6.3 <i>Synthèse des stéroïdes</i>	18
1.6.4 <i>Synthèse des prostaglandines</i>	20
1.6.5 <i>Synthèse des éicosanoïdes</i>	21
1.6.6 <i>Synthèse de vitamines</i>	22
1.7 RÉGULATION DES CYP	23
1.7.1 <i>Induction des CYP</i>	23
1.7.2 <i>Inhibition des CYP</i>	29
2. LA NADPH-RÉDUCTASE	32
2.1 HISTORIQUE DE LA NADPH-RÉDUCTASE	32
2.2 STRUCTURE DE LA NADPH-RÉDUCTASE	34
2.3 RÔLE DE LA NADPH-RÉDUCTASE	36
2.4 RÉGULATION DE LA NADPH-RÉDUCTASE	37
3. INFLAMMATION	38
3.1 RÉACTION INFLAMMATOIRE	40
3.1.1 <i>Phénomènes enclenchés lors de l'inflammation</i>	40
3.1.2 <i>Composantes cellulaires de l'inflammation</i>	41
3.2 RÉACTION INFLAMMATOIRE ET CYP	43
3.2.1 <i>Protéine kinase C</i>	45

3.2.2	<i>Kinase de régulation extracellulaire : Erk (P42/44 MAPK)</i>	46
3.2.3	<i>Protéine kinase activée par les mitogènes : p38 MAPK</i>	48
3.2.4	<i>Phosphatidylinositide 3-kinase</i>	49
3.2.5	<i>Janus kinase/Protéines transductrices de signal et activatrices de transcription</i>	50
3.2.6	<i>Protéines Phosphatases</i>	51
3.3	RÉACTION INFLAMMATOIRE ET NADPH-RÉDUCTASE.....	53
B.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	55
1.	ISOLEMENT DES HÉPATOCYTES.....	56
2.	MESURE DE L'ACTIVITÉ DU CYP3A6.....	58
3.	MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE.....	59
4.	EXPRESSION DU CYP3A6 ET DE LA NADPH-RÉDUCTASE.....	60
5.	ISOLEMENT DE L'ARN MESSAGER DANS DES HÉPATOCYTES.....	61
6.	MESURE DE LA CONCENTRATION DE MONOXYDE D'AZOTE.....	62
7.	ANALYSES STATISTIQUES.....	64
8.	MATÉRIELS.....	65
C.	PROJET DE RECHERCHE	67
1.	LA RÉACTION INFLAMMATOIRE ET L'ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE.....	68
2.	LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES ET L'ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE.....	69
3.	L'IL-6 ET L'IL-1B ET LA PRODUCTION DE MONOXYDE D'AZOTE DANS LE MILIEU CELLULAIRE. 69	
4.	SNP, H ₂ O ₂ ET L'ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE.....	70
5.	INHIBITEURS DE LA VOIE DU P38 MAPK ET DFB.....	71
6.	DIPHÉNYLÈNEIODONIUM (DPI), INHIBITEURS DE LA VOIE DU P38 MAPK ET ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE.....	72
7.	IL-6, INHIBITION DE LA P38 MAPK ET L'ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE.....	73
8.	INHIBITION DES PROTÉINES KINASES ET ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE EN PRÉSENCE D'IL-6.....	74
9.	INHIBITEURS DE PROTÉINES PHOSPHATASES ET ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE.....	74
10.	INHIBITEURS DES PROTÉINES KINASES EN COMBINAISONS AVEC LA CALYCULINE A ET ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE.....	75
D.	RÉSULTATS	76
1.	EFFET DE LA RÉACTION INFLAMMATOIRE SUR LE CYP3A6 ET LA NADPH-RÉDUCTASE.....	77
2.	MODULATION DE LA NADPH-RÉDUCTASE PAR LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES.....	83
3.	EFFET DE L'IL-6 ET DE L'IL-1B SUR LA QUANTITÉ DE NO· DANS LE MILIEU CELLULAIRE.....	90
4.	EFFET DU SNP ET DU H ₂ O ₂ SUR L'ACTIVITÉ DU CYP3A6 ET DE LA NADPH-RÉDUCTASE ..	91
5.	EFFET DU SB203580 ET DU SKF86002 COMBINÉS AVEC LE DFB SUR L'ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE.....	95
6.	ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE EN PRÉSENCE DE DIPHÉNYLÈNEIODONIUM (DPI) ET DES INHIBITEURS DE LA P38 MAPK.....	98

7. EFFET DE L'IL-6 EN PRÉSENCE D'INHIBITEURS DE LA P38 MAPK SUR L'ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE	101
CETTE ÉTUDE PRÉLIMINAIRE NOUS A PERMIS DE CONSTATER QUE L'INCUBATION D'IL-6 À 10 HG/ML PENDANT 24 HEURES NE DIMINUE PAS L'ACTIVITÉ DU CYP3A6. LES RÉSULTATS DES TESTS STATISTIQUES NE SONT PAS ASSEZ PUISSANTS POUR CONCLURE SUR L'EFFET DE L'IL-6 ET DU SB203580 SUR L'ACTIVITÉ DU CYP3A6. CEPENDANT, CETTE ÉTUDE NOUS PERMET D'OBSERVER L'ABSENCE D'EFFET DU SKF86002 SUR L'ACTIVITÉ DU CYP3A6.....	103
8. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE EN PRÉSENCE D'IL-6 ET DE PLUSIEURS INHIBITEURS DES PROTÉINES KINASES	104
9. MODULATION DE L'ACTIVITÉ ET DE LA NADPH-RÉDUCTASE PAR LES PROTÉINES PHOSPHATASES.	106
10. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE LA NADPH-RÉDUCTASE EN PRÉSENCE DE CALYCULINE A ET D'INHIBITEURS DES PROTÉINES KINASES	113
E. DISCUSSION	118
F. CONCLUSION.....	139
G. BIBLIOGRAPHIE	143

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des CYP humain selon leur rôle dans la synthèse des substrats endogènes.....	15
Tableau 2. Différentes classes de protéines phosphatases et leurs substrats.....	52
Tableau 3. Activités du CYP3A6 et de la NADPH-réductase dans des H _{CONT} en présence ou en absence de DPI (n=5), de SB203580 (n=5) et de la combinaison SB203580 + DPI (n=4) *p<0,05 comparé au H _{CONT} **p<0,001 comparé au H _{CONT} . Le SB203580 est ajouté à temps 0 et le DPI une heure après l'ajout de SB203580 au milieu de culture, pour un total de 24 heures d'incubation.....	99
Tableau 4. Activités du CYP3A6, de la NADPH-réductase et du cytochrome <i>b</i> ₅ dans des H _{CONT} en présence ou en absence de DPI (n=5), de SB203580 (n=5), de pHMB (n=3) et de la combinaison de ces produits, SB203580 + DPI (n=4), DPI + pHMB (n=4) et SB203580 + pHMB (n=4). *p<0,05 comparé au H _{CONT} , **p<0,001 comparé au H _{CONT} . Dans ces expériences, le DPI et le pHMB sont ajoutés au milieu de culture 22 heures après le SB203580, c'est-à-dire 2 heures avant la fin de l'incubation. ..	100
Tableau 5. Activités du CYP3A6 et de la NADPH-réductase dans des H _{CONT} en présence ou en absence DPI, de SKF86002, de pHMB ou d'une combinaison de ses produits (n=3). *p<0,05 comparé au H _{CONT} , **p<0,001 comparé au H _{CONT} . Dans ces expériences, le DPI et le pHMB sont ajoutés au milieu de culture 22 heures après le SKF86002, c'est-à-dire 2 heures avant la fin de l'incubation.....	101

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure secondaire et tertiaire du cytochrome P450	5
Figure 2. Cycle catalytique des CYP	7
Figure 3. Formation de dérivés radicalaires de l'oxygène et court-circuit du peroxyde	9
Figure 4. Voie d'élimination des 200 médicaments les plus administrés en 2002 ...	13
Figure 5. Métabolisme du cholestérol	16
Figure 6. Rôle des CYP dans la synthèse des différentes hormones stéroïdiennes.	19
Figure 7. Schéma de la synthèse des prostaglandines.....	20
Figure 8. Voie d'activation de la transcription du CYP3A par PXR.....	24
Figure 9. Voie d'activation de la transcription du CYP3A par CAR.....	26
Figure 10. Activation et rétro-inhibition de la transcription du CYP1A.....	29
Figure 11. Transfert d'électron dans des CYP de la classe b)	33
Figure 12. Structure de la NADPH-réductase.....	35
Figure 13. Mécanisme de transfert d'électrons de la NADPH-réductase au CYP....	37
Figure 14. Voie de signalisation d'ERK	47
Figure 15. Activation de la PI ₃ K.....	50
Figure 16. Action des protéines kinases et des phosphatases	52
Figure 17. Réaction de Griess, formation d'un complexe azoïque.	63
Figure 18. (A) Activité et (B) quantité d'ARN messager de la NADPH-réductase mesurée dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H _{CONT}) et dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire (H _{INFL}), après 24 heures d'incubation. A : n=8, B : n=7. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être détectée. *p <0,05 comparé à H _{CONT}	78

Figure 19. (A) Activité, (B) expression protéique (105592 ± 13285) et (C) quantité d'ARN messager de la *NADPH-réductase* déterminées dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire (H_{INFL}) suite à 48 heures d'incubation. A : n=8, B : n=7, C : n=7. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est, notre contrôle, aucune variation ne peut être détectée *p <0,05 comparé à H_{CONT} 79

Figure 20. (A) Activité et (B) quantité d'ARN messager du *CYP3A6* mesurée dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire (H_{INFL}), après 24 heures d'incubation. A : n=8, B : n=8. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. *p <0,05 comparé à H_{CONT} 81

Figure 21. (A) Activité, (B) expression protéique (H_{CONT} : 25485 ± 10234) et (C) quantité d'ARN messager du *CYP3A6* déterminées dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire (H_{INFL}), suite à 48 heures d'incubation. A : n=9, B : n=8, C : n=6. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. *p <0,05 comparé à H_{CONT} 82

Figure 22. (A) Activité (103 ± 13) n=5, expression protéique (100048 ± 25354) n=4 et ARN messager n=3, de la *NADPH-réductase* dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec du IL-6 (B) Activité (140 ± 10) n=5, expression (79585 ± 18142) n=5 et ARN messager n=4, de la *NADPH-réductase* dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec de l'IL-1 β . L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. *p <0,05 comparé à H_{CONT} 85

Figure 23. (A) Activité (122 ± 8) n= 18, expression protéique (104899 ± 17373) n= 6 et ARN messager n= 7, de la *NADPH-réductase* dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec de l'IFN- γ (B) Activité (132 ± 13) n=9, expression (65516 ± 19882) n=3 et ARN messager n=9, de la *NADPH-réductase* dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec du TNF- α . L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée..... 86

Figure 24. (A) Activité (3257 ± 471) n=5, expression protéique (119196 ± 43741) n=5 et ARN messager n=4, du *CYP 3A6* dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec l'IL-6 (B) Activité (3003 ± 402) n=5, expression (364102 ± 317160) n=4 et ARN messager n=3, du *CYP 3A6* dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec l'IL-1 β . L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée *p <0,05 comparé à H_{CONT} 88

- Figure 25. (A) Activité (3220 ± 303) $n=18$, expression protéique (70296 ± 35035) $n=5$ et ARN messenger $n=8$, du CYP 3A6 dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec l'IFN- γ (B) Activité (3419 ± 557) $n=9$, expression (47872 ± 34334) $n=3$ et ARN messenger $n=4$, du CYP 3A6 dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec du TNF- α . L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée..... 89
- Figure 26. Concentration de nitrites dans le surnageant des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) ($1,9 \pm 0,6$), en présence d'IL-6 ou en présence d'IL-1 β * $p < 0,05$ comparé à H_{CONT} ($n=3$) 90
- Figure 27. (A) Activité du CYP3A6 et (B) l'activité de la NADPH-réductase dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) en présence de concentrations croissantes de SNP ($n=3$)..... 92
- Figure 28. (A) Activité du CYP 3A6 et (B) activité de la NADPH-réductase dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) en présence de concentrations croissantes de H_2O_2 ($n=3$)..... 94
- Figure 29. Fluorescence émise en fonction des concentrations croissantes de SB203580 incubé pendant 24 heures dans du tampon Krebs, sans hépatocytes ($n=1$) 96
- Figure 30. Activité du CYP3A6 dans des hépatocytes procédant de lapin témoin en présence ou en absence de concentrations croissantes de SB203580 et de DFB ($n=1$)..... 97
- Figure 31. Activité du CYP3A6 dans des hépatocytes procédant de lapin témoin en présence de concentrations croissantes de SKF86002, avec et sans DFB ($n=1$)..... 97
- Figure 32. Rapport de l'activité du CYP3A6 dans des H_{CONT} (3155 ± 843), en présence d'IL-6 ($n=5$), de SB203580 ($n=8$) et une combinaison SB203580 et IL-6 ($n=6$). * $p < 0,05$ comparé à H_{CONT} 102
- Figure 33. Rapport de l'activité du CYP3A6 dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) (1181 ± 260), en présence d'IL-6, de SKF et une combinaison SKF et IL-6, ($n=3$) * $p < 0,05$ comparé à H_{CONT} 102
- Figure 34. Rapport de l'activité de la NADPH-réductase dans des H_{CONT} (125 ± 45), en présence d'IL-6 ($n=10$), de SB203580 ($n=14$) et la combinaison SB203580 et IL-6 ($n=8$). * $p < 0,05$ comparé à H_{CONT} 104

- Figure 35. Activité de la NADPH-réductase dans des H_{CONT} (181 ± 41) en présence d'IL-6 et des inhibiteurs de plusieurs voies de signalisation (n = 4) *p <0,05 comparé à H_{CONT}. & p <0,05 comparé à IL-6 où W = wortmanine, LY = LY294002, PD = PD098059 et Pic = piceatannol et PDTC = pyrrolidine dithiocarbamate. 106
- Figure 36. (A) Activité (312 ± 36), (B) expression protéique (278381 ± 18577) et (C) ARN messenger de la NADPH-réductase des H_{CONT} incubés pendant 24 heures en présence d'acide okadaïque (AO) et en présence du calyculine A (CAL) L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. *p <0,05 comparé à H_{CONT} (n=3) 108
- Figure 37. (A) Activité (210 ± 24), (B) expression protéique (413382 ± 13250) et (C) ARN messenger de la NADPH-réductase dans des H_{CONT} incubés pendant 48 heures en présence d'acide okadaïque (AO) et en présence du calyculine A (CAL) L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. *p <0,05 comparé à H_{CONT} (n=3) 109
- Figure 38. (A) Activité (5997 ± 861), (B) expression protéique (185701 ± 20369) et (C) ARN messenger du CYP3A6 dans des H_{CONT} incubés pendant 24 heures en présence d'acide okadaïque et en présence du calyculine A L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. * p <0,05 comparé à H_{CONT} (n=3) 111
- Figure 39. (A) Activité, (B) expression protéique (140135 ± 30665) et (C) ARN messenger du CYP3A6 dans des H_{CONT} (2967 ± 127) incubés pendant 48 heures en présence d'acide okadaïque et en présence du calyculine A L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. *p <0,05 comparé à H_{CONT} (n=3) 112
- Figure 40. (A) Activité, (B) expression protéique (360579 ± 24424) dans des H_{CONT}, incubés pendant 48 heures avec différents inhibiteurs et en présence de calyculine A (Cal) *p <0,05 comparé à H_{CONT} (n=3) où Bis = bisindolylmaléimide IV, LY = LY294002, PD = PD098059, PDTC = pyrrolidine dithiocarbamate et SB = SB203580. 115
- Figure 41. (A) Activité (B) expression protéique (57237 ± 9278) du CYP3A6 dans des H_{CONT}, incubés avec différents inhibiteurs, en présence de calyculine A (Cal) *p <0,05 comparé à H_{CONT} (n=3) où Bis = bisindolylmaléimide IV, LY = LY294002, PD = PD098059, PDTC = pyrrolidine dithiocarbamate et SB = SB203580. 117
- Figure 42. Schéma résumant les différentes conditions expérimentales étudiées, susceptibles de modifier l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6. 122

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AMP : adénosine mono-phosphate

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

BIS : bisindolylmaléimide IV

CAR : récepteur constitutif l'androstane

CYP: cytochrome P450

DAG: diacyl-glycérole

DPI: diphénylèneiodonium

Erk: extracellular signal-regulated kinases

FAD: flavine adénine dinucléotide

FMN: flavone mono-nucléotide

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

H_{CONT} : hépatocytes provenant d'un lapin contrôle

H_{INFL} : hépatocytes provenant d'un lapin ayant une réaction inflammatoire

IC₅₀ : concentration inhibitrice 50%

IL: interleukine

IFN : interféron

IP3: inositol-3 phosphate

JAK: kinase Janus

JNK: kinase Jun N-terminal

LPS: lipopolysaccharide

LY: LY294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one hydrochloride)

MAPK : protéine kinase des mitogènes activés

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Nf-kB : facteur nucléaire kappa B

NO· : monoxyde d'azote

OH· : radical hydroxyle

PBREM : élément de réponse au phénobarbital

PD: PD098059 (2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one)

PDTC: pyrrolidine dithiocarbamate

PG: prostaglandine

pHMB: p-hydroxymercurybenzoate

PKC: protéine kinase C

PP1-PP2: protéine phosphatase 1/2

PPA : protéines de phase aigüe

PPAR : récepteurs activés des proliférateurs de peroxyosomes

PXR : récepteur X aux prégnanes

ROS : dérivés radicalaires de l'oxygène

RXR : récepteur X aux rétinoïdes

SB : SB203580 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole)

SKF : SKF86002 (6-(4-Fluorophenyl)-5-(4-pyridyl)-2,3-dihydroimidazo[2,1-b]-thiazole)

STAT : activateur de transcription et transducteur de signalisation

TNF : facteur de nécrose tumorale

TX : thromboxane

W : wortmannine

REMERCIEMENTS

Premièrement, je remercie mon directeur de recherche le Dr. Patrick du Souich pour m'avoir fait aimer le domaine de la pharmacologie par son enseignement hors pair, pour les multiples discussions sur la NADPH-réductase et pour son incroyable patience. J'aimerais aussi remercier tous mes collègues qui m'ont fait connaître les joies du travail de laboratoire. Lucie Héroux pour son dynamisme et ses précieux conseils, Joëlle Batonga pour ses encouragements incessants et sa bonne humeur, Mélanie Gabriac pour sa gaîté et son sens de l'humour.

Bien entendu, je n'aurais pas pu passer au travers des multiples obstacles sans le soutien de mon mari, Claude Sylvain. Merci de tout mon cœur d'être chaque jour à mes côtés pour m'écouter et m'appuyer dans mes décisions et mon cheminement. Merci aux membres de ma famille, papa, maman, Daniel et mamie pour votre support moral. Je suis très reconnaissante de tout ce que vous faites pour moi, que ce soit un restant de repas, un tour au centre d'achat ou de simples discussions.

Bien étrange que cela puisse paraître, j'aimerais remercier toutes les personnes qui se sont virtuellement tenues à mes côtés pendant ma maîtrise pour toutes les heures de plaisirs que nous avons passées ensemble. Vous m'avez tous permis de belles escapades dans ce monde imaginaire : Metztlimorte (Mario), Kortesh (Brandon), Silverspoon (Ryan), Chewy (Mike), Duverschica (Autumn), HoneyBabe (Nichole), Ishtell (Nate), Tahrn (William), Bizbang (Aaron), Demoniacal (noob aka Scott), Lady (Priesca), Aravain (Bill), Chronix (Nathan) et tout le reste!

A. Introduction

1. Le Cytochrome P450

Dans les sections qui suivent, nous allons discuter de la découverte des enzymes du cytochrome P450, de leur nomenclature, de leur importance dans la biotransformation des médicaments et des substrats endogènes ainsi que de leur régulation.

1.1 Historique du cytochrome P450

Le cytochrome P450 inclut une superfamille d'enzymes (CYP) qui permettent l'oxydation d'une large gamme de substrats. Le processus de biotransformation catalysé par les CYP sert d'une part à la synthèse et à la dégradation de substrats endogènes et d'autre part à biotransformer des substances exogènes. Les CYP ont été caractérisés pour la première fois par Mason aux États-Unis et Hayaishi au Japon (Mason, 1957; Hayaishi, 1964). Le terme cytochrome se divise en deux parties qui signifient : « cyto » pour cellule et « chrome » pour couleur. Garfinkel et Klingenberg étudiaient les pigments des microsomes du foie et ils ont observé, par spectrométrie, un pic d'absorption à 450 nm lorsque les CYP forment un complexe avec le monoxyde de carbone (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958). Ce n'est qu'en 1964 qu'Omura et Sato ont caractérisé ce pigment comme étant le cytochrome P450 (Omura et Sato, 1964).

1.2 Nomenclature des CYP

Le projet du génome humain a permis d'identifier 63 gènes des CYP, dont 5 pseudogènes. Le quart de protéines exprimées par ces gènes sont utilisées lors de la biotransformation des xénobiotiques.

Bien que les CYP soient reconnues pour leur rôle dans la biotransformation des médicaments au niveau du foie, certains isoformes sont présents dans l'intestin grêle, l'iléon, le colon, le pancréas, le cerveau, les poumons, les glandes surrénales, les reins, la moelle épinière, les mastocytes, la peau, les ovaires et les testicules (Chang et Kam, 1999). Les CYP peuvent également être exprimés dans différents compartiments subcellulaires (membrane nucléaire externe, réticulum endoplasmique, mitochondrie, golgi, peroxysoxe et la membrane plasmique) (Nelson et coll., 1996).

La nomenclature des CYP est établie par un système se basant sur les séquences d'acides aminés communes entre les différents enzymes. Afin de mieux catégoriser chaque famille d'enzymes, des règles de nomenclature ont été établies (Nelson et coll., 1996). Le nom de chaque enzyme débute par le préfix « CYP », la famille est représentée par un chiffre arabe (1, 2, 3 ...), les protéines d'une même famille ont une homologie de 40% dans leur séquence d'acides aminées. La sous-famille de l'enzyme est représentée par une lettre majuscule (A, B, C...) et les enzymes d'une même sous-famille ont une homologie de séquences de 55%. Enfin, l'isoforme est représenté par un deuxième chiffre arabe (1, 2, 3 ...) et présente une homologie de

séquence de 70%. Au total, chez les mammifères, il existe 18 familles, 43 sous-familles et 136 iso formes (Chang et Kam, 1999).

1.3 Structure des CYP

La figure 1a) représente la structure topographique des hélices alpha et des feuillets bêta de la structure secondaire des CYP. Le domaine bêta se compose de plusieurs feuillets bêta, représentés par les rectangles bleus. Le domaine alpha est composé de plusieurs repliements de type hélice représentés par les flèches de couleur crème et identifiés par différentes lettres D, E, F, G, I, J, K, L (figure 2b). Les CYP sont composés d'un groupement prosthétique hème, en rouge, qui par son atome de fer permet l'hydroxylation des substrats (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). L'hélice I joue un rôle primordial, car suite à la liaison du substrat à la poche lipophile, l'hélice I change de conformation et emprisonne le substrat dans le site actif. Les domaines qui sont les plus rapprochés du groupement hème sont généralement les plus conservés entre les différentes familles, surtout les hélices I et L qui touchent directement l'hème. On peut discerner l'endroit où se lie le substrat par la couleur jaune. Chez les eucaryotes, les CYP sont des protéines ancrées à une membrane. La grande majorité des CYP contiennent une boucle d'ancrage au réticulum endoplasmique, représentée par la lettre N dans la figure 1b.

La structure tridimensionnelle est adaptée pour le fonctionnement du groupement hème, ainsi que pour l'activation de l'oxygène, pour l'association de partenaires de réduction/oxydation et pour la stéréochimie, nécessaire à la reconnaissance du substrat.

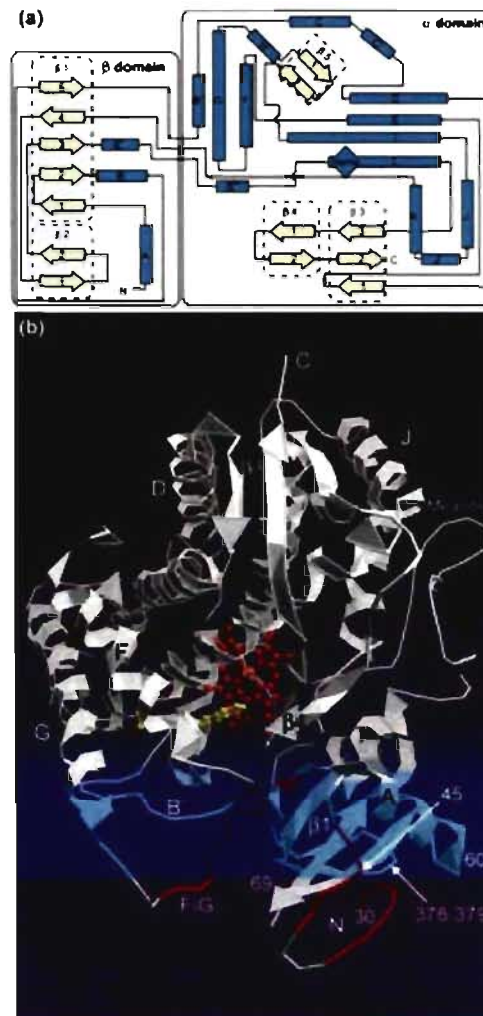


Figure 1. Structure secondaire et tertiaire du cytochrome P450

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

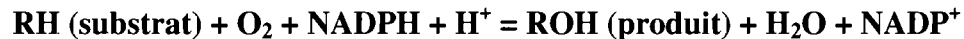
1.4 Fonctions des CYP : substrats exogènes

Les médicaments absorbés dans l'organisme sont soit excrétés sans modification ou biotransformés en d'autres composés. Ces composés peuvent être à leurs tours éliminés ou subir d'autres biotransformations. Le but de la biotransformation est

d'augmenter l'hydrosolubilité d'un composé lipophile et non polaire pour lui permettre d'être plus facilement excrété par les systèmes rénal et biliaire.

En 1955, Axelrod a démontré que le métabolisme de médicaments comme l'acétaminophène ou l'éphédrine, dans les microsomes de foie de lapin, nécessite la présence de nucléotides triphosphopyridines réduits et d'oxygène, observation qui lui a valu le prix Nobel de médecine de 1970 (Axelrod, 1955).

Le processus de biotransformation des substrats exogènes consiste en deux phases distinctes. La phase I comprend des réactions de monooxygénation catalysées par les CYP et nécessite la présence de nucléotide adénine di-phosphate (NADPH). L'oxydation des différents substrats est effectuée lors d'un cycle catalytique dans lequel le transfert des électrons est primordial. La monooxygénation est le transfert d'un atome d'oxygène au substrat. Le second atome d'oxygène sert à la formation d'eau selon l'équation suivante :



Les substrats vont être soumis à un cycle catalytique afin de subir des déshydrogénations, des hydratations d'époxydes, des réductions ou des hydrolyses (Katzung, 2004). Le cycle catalytique des substrats par les CYP se déroule en sept étapes comme le démontre la figure 2.

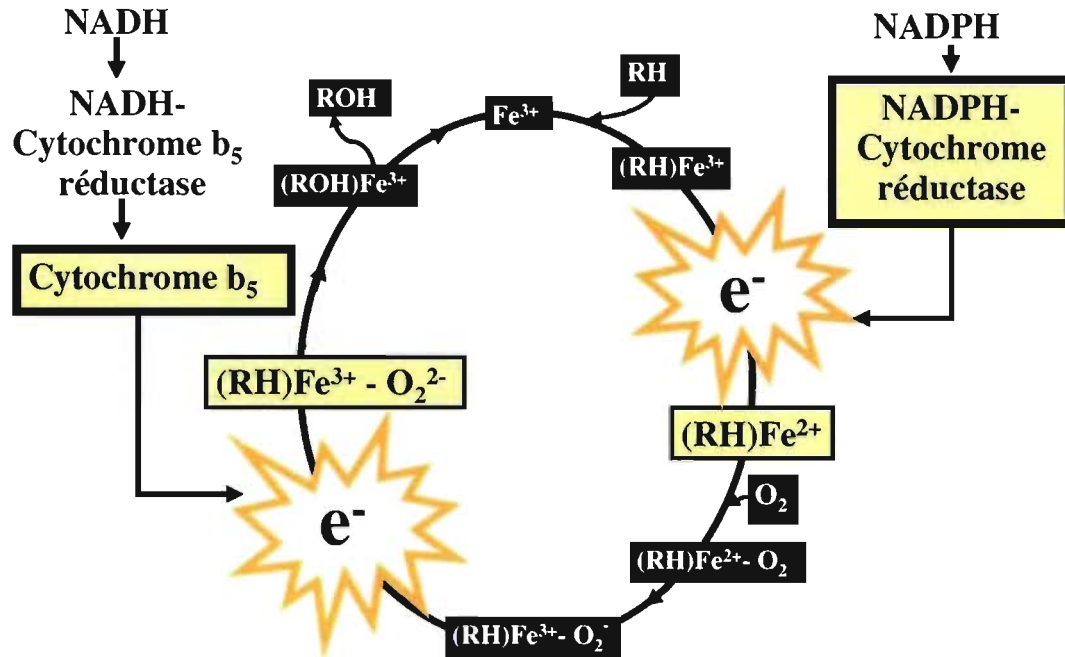


Figure 2. Cycle catalytique des CYP

Étapes :

- 1- Liaison du substrat : RH à l'atome de fer des CYP.
- 2- Réduction du fer de l'état ferrique (Fe^{3+}) à ferreux (Fe^{2+}), nécessite la participation de la NADPH-réductase qui fournit l'électron essentiel à la réduction.
- 3- Liaison de l'oxygène à l'atome de fer formant le complexe $(\text{RH})\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ qui par la réorientation d'électron, oxyde le (Fe^{2+}) ferreux en (Fe^{3+}) ferrique formant le $(\text{RH})\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^\bullet$
- 4- Activation de l'oxygène par un électron venant de la NADPH-réductase ou du cytochrome b₅ ; protonation et formation du $(\text{RH})\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^{2-}$ un produit réactif.
- 5- Transposition de l'hydrogène du substrat (R) pour former un hydroxyle (OH)
- 6- Recombinaison de l'hydroxyle (OH) avec les carbonnes du substrat (R)
- 7- Dissociation du substrat hydroxylé (ROH) du noyau de fer.

Les étapes 2 et 4 de ce cycle représentent des étapes limitantes de la biotransformation des substrats. D'après les études de Yamazaki, l'activité maximale du CYP, évaluée par la formation de métabolites de la testostérone, est atteinte lorsque le rapport CYP/NADPH-réductase est de 1:2 dans la cellule (Yamazaki et coll., 1996). Or, des études ont démontré que dans le foie, les CYP sont en excès par rapport à la NADPH réductase. Le ratio mesuré est de 10:1 ou de 20:1 dépendamment de l'état d'induction (Estabrook et coll., 1971). L'interruption du cycle catalytique peut conduire à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui, en quantité élevée, peuvent contribuer au stress oxydatif de la cellule. En absence de donneur d'électrons, comme la NADPH-réductase, le cycle catalytique peut continuer à exercer sa fonction grâce à la présence de peroxyde, en créant un court circuit par le peroxyde, comme montré dans la figure 3.

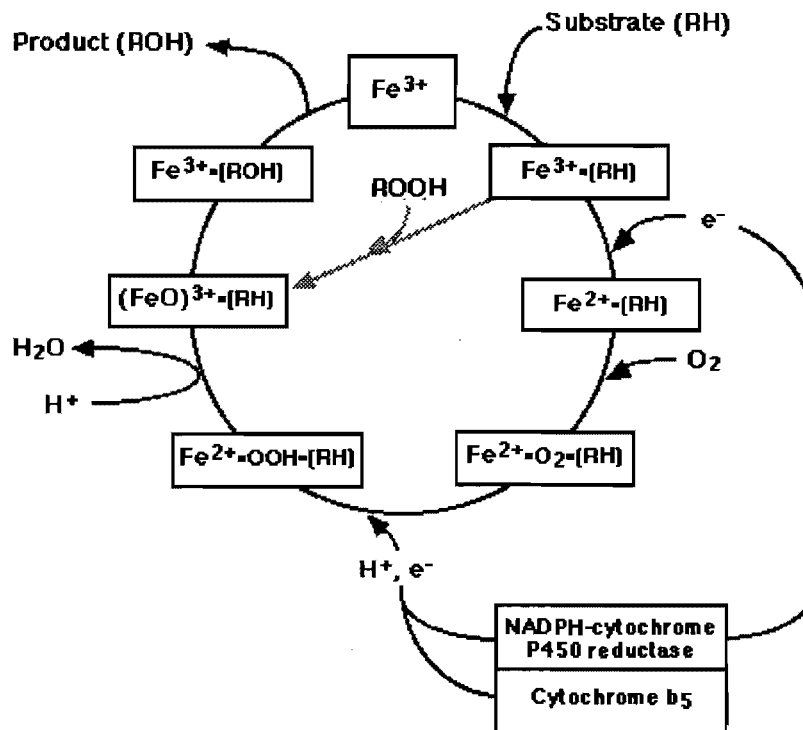


Figure 3. Formation de dérivés radicalaires de l'oxygène et court-circuit du peroxyde
 Source : <http://zoology.muohio.edu/>

Les réactions de phase II peuvent être des glucuronidations, des sulfonations, des acétylations, des réactions de conjugaison au glutathion et aux acides aminés. Ces réactions vont modifier la structure de la molécule afin d'augmenter sa solubilité dans l'eau et d'être excrétée. La majorité des réactions de phase II sont effectuées dans le cytosol, sauf la réaction de glucuronidation qui a lieu dans le réticulum endoplasmique (Parkinson, 1995).

Les sections qui suivent détaillent les rôles des CYP impliqués dans la biotransformation. La biotransformation des xénobiotiques implique principalement trois familles des CYP : les familles CYP1, CYP2 et CYP3.

1.4.1 Fonctions des enzymes de la famille CYP1

1.4.1.1 *CYP1A1*

Le CYP1A1 est principalement localisé dans les tissus extrahépatiques et son activité enzymatique peut être mesurée par la réaction d'O-dééthylation de la méthoxyresorufin. Le CYP1A1 biotransforme les procarcinogènes en métabolites carcinogènes, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques, composés électrophiles hautement réactifs qui peuvent endommager l'ADN et provoquer, à la longue, une carcinogenèse (Zhang et coll., 2004).

1.4.1.2 *CYP1A2*

Localisé dans le foie, le CYP1A2 compte pour environ 15% du contenu total des CYP dans le foie. Il biotransforme préférentiellement les amines aromatiques, ainsi que les hydrocarbures aromatiques polycycliques et il est responsable de la biotransformation de 17 β -œstradiol après sa conversion initiale de l'estrone (Chie-Chen et coll., 2004). L'activité enzymatique du CYP1A2 peut être mesurée par l'O-dééthylation de l'éthoxyresorufine ou par l'O-dééthylation de la phenacétine.

1.4.2 Fonctions des enzymes de la famille CYP2

1.4.2.1 *CYP2A6*

Le CYP2A6 est connu pour son rôle prépondérant dans la biotransformation de la nicotine. Des études ont démontré que les individus ayant une activité diminuée du CYP2A6 présentent un ralentissement de la biotransformation de la nicotine. Les individus avec un CYP2D6 peu actif fument moins de cigarettes que la majorité des

fumeurs (Pianezza et coll., 1998). L'activité de cette enzyme est évaluée par le biais de la 7-hydroxylation du coumarin en mesurant le 7-hydroxycoumarin.

1.4.2.2 CYP2D6

Le CYP2D6 est impliqué dans la biotransformation de 20 à 30% des médicaments sur le marché, incluant les antihypertenseurs, les antipsychotiques, les β -bloqueurs, les antiarhythmiques de classe I, le débrisoquine, le dextrométhorphan, le tamoxifène, les antidépresseurs tricycliques, *etc.* (Yu et coll., 2004). L'activité *in-vitro* du CYP2D6 peut être évaluée par la O et N-dééthylation du dextrométhorphan (Yu et coll., 2001). Chez les humains, le phénotype du CYP2D6 est déterminé par la mesure du 4-hydroxydebrisoquine dans l'urine, suite à la biotransformation de la débriquisone (Mahgoub et coll., 1977).

1.4.2.3 CYP2C

Le CYP2C8 est responsable de la biotransformation du taxol utilisé contre le cancer du sein, il contribue aussi à l'oxydation de la troglitasone, du vérapamil, du rosiglitasone, de la cérvastatine, de l'amiodarone *etc.* (Rendic, 2002). Le CYP2C8 est majoritairement présent dans le foie et dans le rein (Dai et coll., 2001).

Le CYP2C9 joue un rôle dans la biotransformation des anti-inflammatoires non-stéroïdien comme le diclofénac, l'ibuprofène, le naproxène, le piroxicame et le celecoxib (Pilotto et coll., 2007). Il intervient dans l'hydroxylation de médicaments antidiabétiques tels que le tolbutamide, le glimépiride et le glipizide. Le CYP2C9

participe aussi à la biotransformation de la phénytoïne (un antiépileptique), du losartan (un antagoniste du récepteur à l'angiotensine II) et de la warfarine (un anticoagulant) (Kirchheiner et Brockmöller, 2005). L'activité du CYP2C9 peut être étudiée par l'hydroxylation du tolbutamide et de la warfarine (Katzung, 2004).

Le CYP2C19 hydroxyle les inhibiteurs de la pompe à proton, comme l'oméprazole et il est aussi responsable de la 5-hydroxylation de la thalidomide (Chiba et coll., 1993; Ando et coll., 2002). La 4-hydroxylation de la S-méphénytoïne est la réaction utilisée pour déterminer l'activité catalytique du CYP2C19 (Shimada et coll., 1986).

1.4.2.4 CYP2E

Localisé majoritairement dans le foie, l'action catalytique du CYP2E1 ne s'étale que sur un petit groupe de substrat comme l'éthanol, le benzène et le styrène (Guengerich et coll., 1991).

1.4.3 Fonctions des enzymes de la famille CYP3

Au total les enzymes de la sous-famille du CYP3A constituent 30% des CYP dans le foie, l'enzyme la plus abondante étant le CYP3A4. Cette isoforme est la plus importante pour la biotransformation des médicaments car elle catalyse plus de 50% des médicaments. Les différents substrats du CYP3A4 comprennent, entre autres, l'acétaminophène, la cocaïne, le cortisol, la cyclosporine, le diazépam, la lidocaïne, la méthadone, la quinidine, le ritonavir, la spironolactone, le tétrahydrocannabinole *etc.* (Katzung, 2004). Bien que majoritairement présent dans le foie, le CYP3A4 se retrouve aussi dans l'intestin grêle (Guengerich, 1999), les

poumons (Raunio et coll., 1999), l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le colon et les reins (de Waziers et coll., 1990).

La sous-famille CYP3A est celle qui est la plus exprimée dans l'organisme humain. En plus du CYP3A4, la sous-famille CYP3A comprend le CYP3A5, le CYP3A7 et le CYP3A43. Le CYP3A5 a 85% d'homologie et a la même spécificité de substrat que le CYP3A4 (Wrighton et coll., 1990). Le CYP3A7 catalyse l'hydroxylation de la testostérone, l'hydroxylation de la droépiandrostérone (DHEA) et l'hydroxylation de l'acide rétinoïque (Kitada et coll., 1987a; 1987b; Chen et coll., 2000a).

Le schéma présenté dans la figure 4, résume le rôle des différents enzymes dans la biotransformation des médicaments sur le marché :

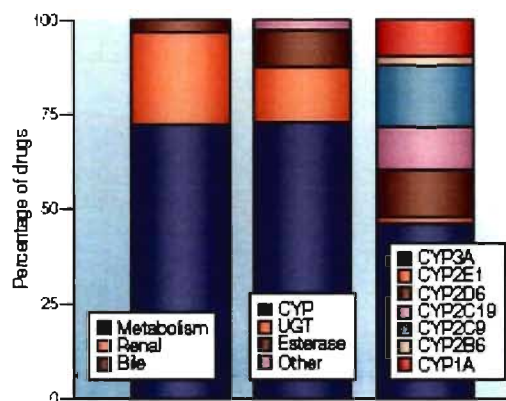


Figure 4. Voie d'élimination des 200 médicaments les plus administrés en 2002

Source: Wienkers et Heath, 2005

1.5 Génétique

Le polymorphisme génétique est causé par des mutations dans la séquence nucléotidique de l'ADN d'un gène dans une population. Un gène est considéré comme polymorphe s'il existe au moins deux allèles à une fréquence égale ou supérieure à 1%. La majorité des différences alléliques sont causées par des polymorphismes retrouvés sur un seul nucléotide (SNP pour « single nucleotide polymorphism »). L'exemple le plus connu est le polymorphisme du CYP2D6. La population se divise en trois groupes phénotypiques: les métaboliseurs lents (ML), les métaboliseurs intermédiaires (MI) et les métaboliseurs rapides (MR). Les sujets ML présentent une activité du CYP2D6 réduite, au contraire, l'hydroxylation de la debrisoquine par le CYP2D6 chez les individus MR sera rapide tandis que les métaboliseurs intermédiaire auront une activité enzymatique normale (Gonzalez et coll., 1988). Le polymorphisme du CYP2D6 est important, car comme mentionné plus haut, il catalyse la biotransformation de plusieurs médicaments dont la codéine, la dextrométhorphan, le métoprolol et les antidépresseurs tricycliques (Katzung, 2004).

De la même façon, le polymorphisme du CYP2C19 se caractérise par des individus ML et des individus MR. La présence d'un polymorphisme pour le CYP2C19 est cliniquement importante pour les médicaments biotransformés par cet enzyme, comme le diazépam, la S-méphénytoïne, le naproxène, l'oméprazole et le propranolol (Katzung, 2004).

1.6 Fonctions des CYP : substrats endogènes

En 1963, Estabrook et coll. ont étudié le rôle des CYP dans l'hydroxylation en position C21 des stéroïdes dans la corticosurrénale (Estabrook et coll., 1963). Cette étude démontre le rôle primordial des CYP dans la formation de substances endogènes telles que les stéroïdes.

Le Tableau 1 illustre le rôle des CYP en fonction de la synthèse des substances endogènes auquel ils participent (Guengerich, 2006).

Stéroïdes	Acides Gras	Eicosanoïdes	Vitamines	Inconnus
1B1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1		8A1	26C1	3A43
11B1			27B1	4A22
11B2				4F11
17A1				4F22
19A1				4V2
21A2				4X1
27A1				4Z1
39A1				20A1
46A1				27C1
51A1				

Tableau 1. Classification des CYP humain selon leur rôle dans la synthèse des substrats endogènes

Source : Tableau modifié, venant de : Guengerich, 2006

1.6.1 Métabolisme du Cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols et un composant essentiel des membranes cellulaires. Il est le précurseur de plusieurs molécules dont la vitamine D, les hormones stéroïdiennes et les acides biliaires. Comme le montre la figure 5, seulement un isoforme des CYP est impliqué dans la synthèse du cholestérol à partir de l'acétyl-CoA, le CYP51. Treize isoformes participent à sa transformation, sept pour la biosynthèse des acides biliaires (CYP7A1, CYP27A1, CYP46A, CYP7B1, CYP39A1, CYP8B1, et CYP3A4) et six pour la biosynthèse des stéroïdes (CYP11A1, CYP17A1, CYP21, CYP19A1, CYP11B1 et CYP11B2) (Pikuleva et coll., 2006).

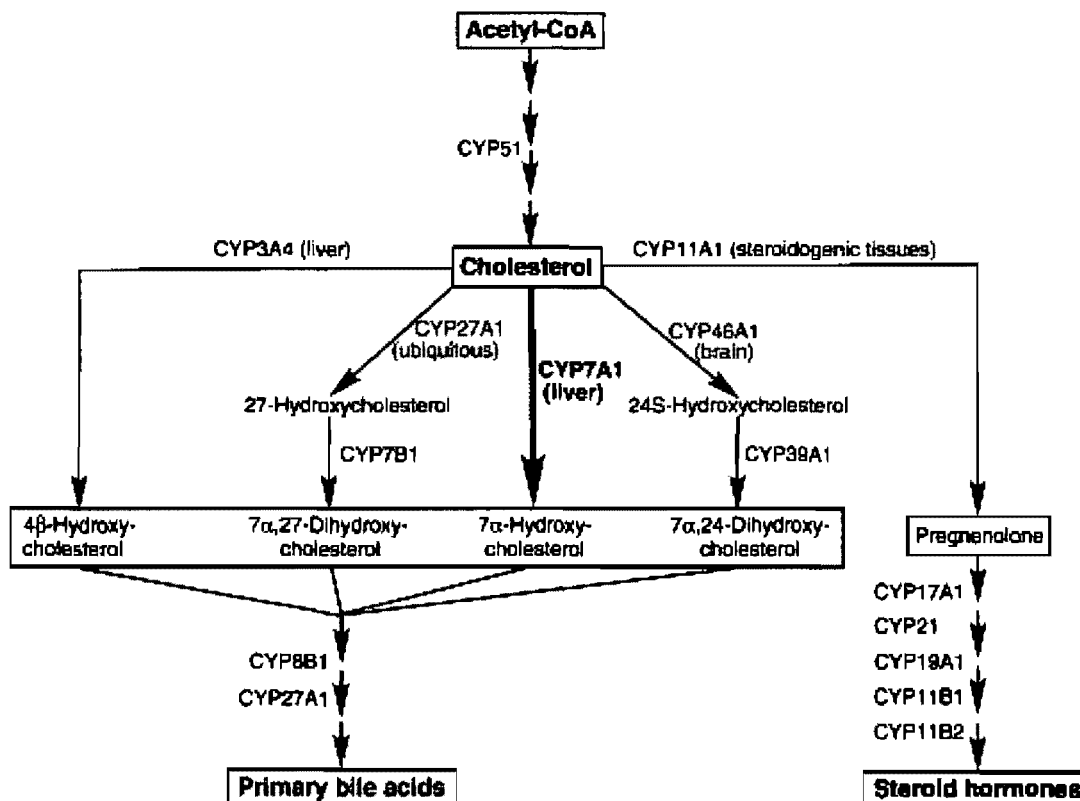


Figure 5. Métabolisme du cholestérol

Source : Pikuleva et coll., 2006

La réaction dominante de la biotransformation du cholestérol et de la synthèse des acides biliaires est la conversion du cholestérol en 7 α -hydroxycholestérol par le CYP7A1 (Myant et Mitropoulos, 1977). Une mutation du CYP7A1 entraîne une élévation des lipoprotéines à basse densités (LDL), une accumulation de cholestérol au niveau du foie et une diminution de l'excrétion des acides biliaires (Pullinger et coll., 2002). Le CYP27A1 converti le cholestérol en 27-hydroxycholestérol qui se lie aux récepteurs X du foie, LXR α et LXR β (LXR pour liver X receptor). Cette liaison active la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (Fu et coll., 2001). Le CYP11A1 converti le cholestérol en pregnénolone dans les tissus stéroïdogéniques (glandes surrénales, ovaires, testicules, placenta et cerveau) (Stone et Hechter, 1954). Dans le cerveau, le cholestérol est transformé par le CYP46A1 en 24S-hydroxycholestérol (Lund et coll., 1999). Le CYP3A4 converti le cholestérol en 4 β -hydroxycholestérol à une vitesse de 0,3 mg/jour (Bodin et coll., 2002); le 4 β -hydroxycholestérol est un puissant activateur de LXR α (Janowski et coll., 1996).

1.6.2 Synthèse des acides biliaires

Les acides biliaires sont des molécules bipolaires. La synthèse des acides biliaires est initiée par la transformation du cholestérol en 27-hydroxylase (CYP27) et 7 α -hydroxylase (CYP7), respectivement (Javitt, 1994). Les acides biliaires les plus importants sont l'acide chénodéoxycholique (45%) et l'acide cholique (31%). Ces acides sont conjugués dans le foie pour former les sels biliaires primaires : le glycocholate, le glycochénate, le taurocholate et le taurochénate. Une fois excrétés dans l'intestin, les sels biliaires primaires sont utilisés comme cofacteurs pour

l'activité de la lipase pancréatique, aidant ainsi à la digestion des lipides. Suite à l'émulsification des lipides, les acides biliaires sont majoritairement réabsorbés pour retourner au foie.

1.6.3 Synthèse des stéroïdes

Les isoformes les plus impliqués dans la synthèse des stéroïdes sont les CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, CYP19A1 et CYP21A2. Le cholestérol est hydroxylé en position C21 par le CYP21 pour ensuite être converti en androgène et en œstrogène. Le clivage du cholestérol forme aussi les minéralocorticoïdes qui sont essentiels pour l'absorption de sodium et de potassium, ainsi que les glucocorticoïdes activateurs de la glucogénèse, du glucagon et de la dégradation de protéines. Comme le montre la figure 6, la synthèse des stéroïdes est principalement effectuée dans la corticosurrénale, dans les trois zones, la *Zona fasciculata*, la *Zona Glomérula* et la *Zona réticularis*.

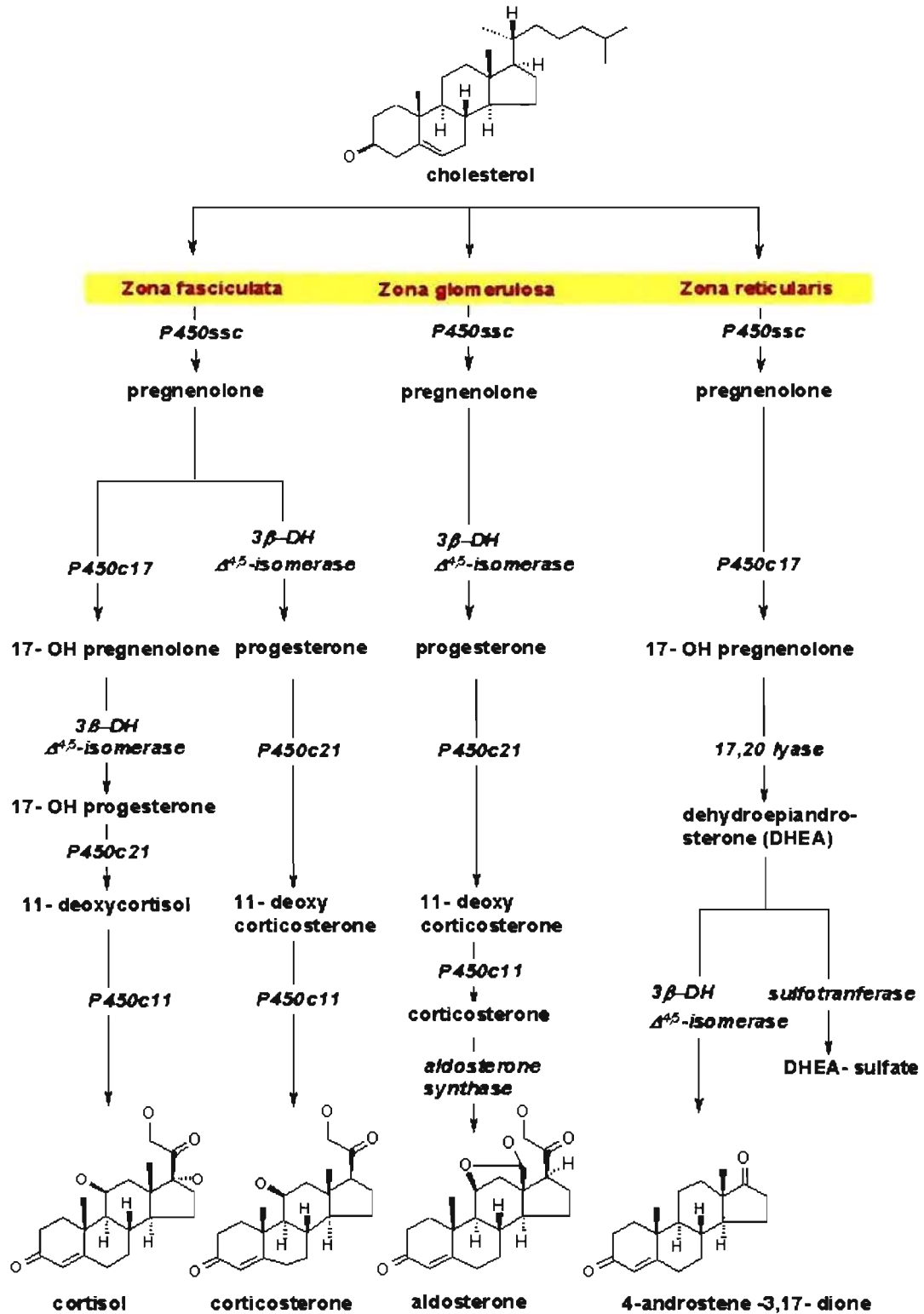


Figure 6. Rôle des CYP dans la synthèse des différentes hormones stéroïdiennes.

Source : <http://www.med.unibs.it/~marchesi/sterhorm.html>

1.6.4 Synthèse des prostaglandines

Les prostaglandines proviennent du métabolisme de l'acide arachidonique et elles contribuent à l'homéostasie cardiovasculaire (Simmons et coll., 2004). Le CYP5A1 et le CYP8A1 communément appelés thromboxane synthétase (TXA synthase) et prostacycline synthase (PGI synthase) respectivement, interviennent dans la synthèse de prostaglandines, schématisé dans la figure 7.

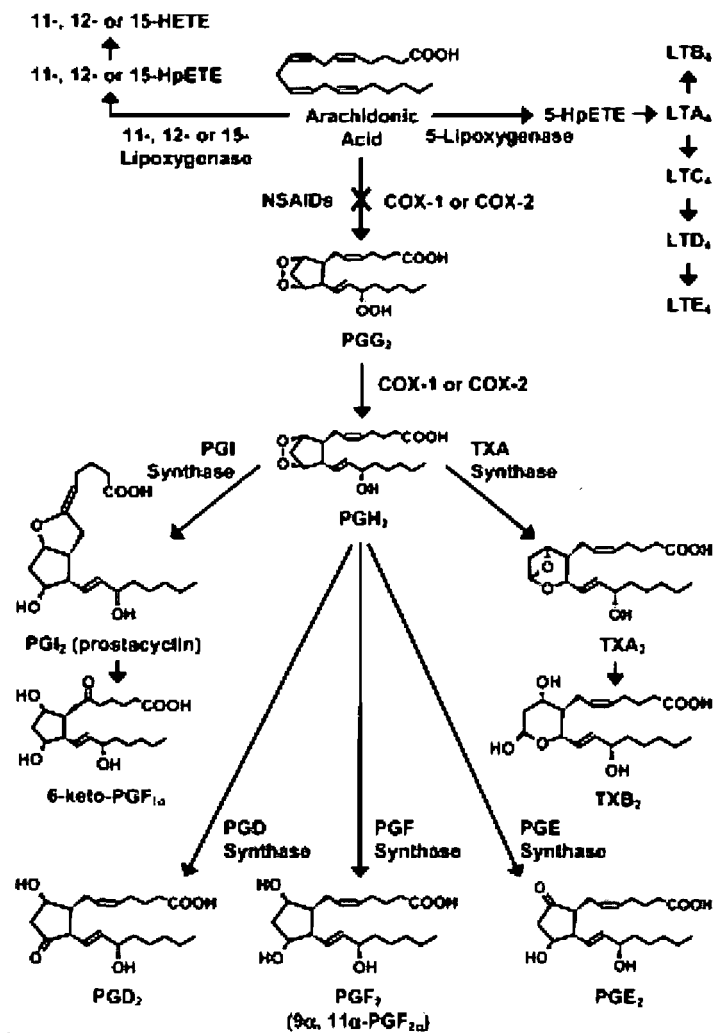


Figure 7. Schéma de la synthèse des prostaglandines

Source : Simmons et coll., 2004

La prostaglandine PGE₂ contracte le muscle lisse de l'intestin et contracte les muscles des bronches par son action sur le récepteur E1 des prostaglandines. Via EP₂, la PGE₂ cause la bronchodilatation, la vasodilatation et la relaxation du muscle lisse de l'intestin (Rang et coll., 2003). Les différentes prostaglandines E favorisent la relâche de l'hormone de croissance, de prolactine, de la thyroïdostimuline (TSH), de l'hormone corticotrope (ACTH), de l'hormone folliculostimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH) (Katzung, 2004). La PGI₂ cause la vasodilatation et agit surtout en inhibant l'agrégation plaquettaire. La PGD₂ est un bronchoconstricteur par ses effets sur les récepteurs T aux prostaglandines. La PGD₂ a des effets vasodilatateurs et de relaxation de muscle de l'intestin et utérin. La thromboxane A₂ (TXA), une autre prostaglandine, est un puissant vasoconstricteur et favorise l'agrégation des plaquettes (Rang et coll., 2003). Lors d'une réaction inflammatoire, les prostaglandines sont présentes en grande concentration dans le site d'inflammation. Elles activent la réponse inflammatoire et sont responsables de la fièvre et de la douleur (Katzung, 2004).

1.6.5 Synthèse des éicosanoïdes

Comme les prostaglandines, les éicosanoïdes sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique mais sont formés par l'action des lipoxygénases. Les CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2, CYP4A11, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3 et CYP4F8 hydroxylent les éicosanoïdes et participent ainsi à la formation des leucotriènes, de la thromboxane A₂ et de la prostacycline (pas inclus dans la figure 7). L'acide arachidonique est transformé en acide hydroperoxy-éicosatétranoïque HPETE, pour

ensuite être transformé en différentes leucotriènes. Ces molécules jouent un rôle dans l'inflammation en influençant la migration cellulaire, la microcirculation et la perméabilité capillaire. Les leucotriènes modulent les fonctions du système immunitaire en régulant les lymphocytes T, les cellules NK (cellules tueuses), les macrophages, les éosinophiles et les neutrophiles. Les symptômes de l'asthme sont en partie le résultat de l'action des leucotriènes : augmentation de la production de mucus, bronchoconstriction, infiltration des cellules inflammatoires et obstruction des voies respiratoires (Yoshiko et Calhoun, 2006).

1.6.6 Synthèse de vitamines

En plus de provenir de notre alimentation, l'exposition aux rayons UV du soleil permet à notre corps de synthétiser la vitamine D à partir du cholestérol, mais ceci requiert l'action d'enzymes comme le CYP24A1, CYP27A1 et CYP27B1. La vitamine D₃ ou cholécalférol est générée dans la peau après l'exposition au soleil. Afin d'être transformé en forme active, le cholécalférol est biotransformé dans le foie par la 25-hydroxylase (CYP27A1) et dans le rein par la 25-hydroxyvitamine D₃ 1-alpha-hydroxylase (CYP24A1) (Guengerich, 2005). La fonction métabolique de la vitamine D est de réguler les niveaux sanguins de calcium et de phosphore en participant à l'absorption intestinale de ces minéraux.

La vitamine A, aussi appelée rétinol, est une substance antioxydante essentielle à une bonne vision et à la croissance des os. Le rétinol est essentiel à la synthèse de la rhodopsine, un pigment impliqué dans la vision de nuit. La vitamine A est également importante dans le fonctionnement des cellules épithéliales, de même que

dans l'homéostasie cellulaire, dans la synthèse de l'hormone de croissance et dans la spermatogénèse. La vitamine A provient de sources alimentaires comme les œufs ou le lait, ainsi que des caroténoïdes retrouvés dans les carottes et les épinards. La synthèse de l'acide rétinoïque par la biotransformation du rétinol est catalysée par le CYP26A1 (White et coll., 1997).

1.7 Régulation des CYP

À la suite de la découverte de l'importance des CYP dans la biotransformation de substances exogènes et dans la synthèse de composés endogènes, les mécanismes moléculaires de la régulation des CYP ont été amplement étudiés. La section suivante décrit les mécanismes de régulation négative et positive des CYP.

1.7.1 Induction des CYP

L'exposition de l'organisme aux xénobiotiques peut entraîner l'augmentation de l'expression des CYP. L'induction des CYP est un processus hautement régulé et contrôlé par transcription génique. L'induction des différents CYP se fait par la liaison de récepteurs nucléaires au promoteur du gène afin d'augmenter sa transcription. Dans les sections suivantes, nous allons présenter les différents récepteurs nucléaires et leurs rôles dans la régulation des CYP.

1.7.1.1 Récepteur X Prénane (PXR)

Le PXR est majoritairement exprimé dans le foie et l'intestin, mais il est aussi présent dans le rein et le cerveau. L'induction des enzymes de la sous-famille du CYP3A dépend de l'activation de la transcription génique par le PXR. Le PXR est activé par une variété de composés inducteurs des enzymes du CYP3A : la 16-

carbonitrile prégénolone, la rifampicine, le taxol, le clotrimazole, le phénobarbital, la spironolactone, etc. (Kliwer et coll., 2002). Faisant parti de la sous-famille des récepteurs nucléaires 1 (NR1), le PXR augmente la transcription du CYP3A en formant un hétérodimère avec le récepteur X du rétinoïde (RXR) (figure 8). Cet hétérodimère se lie à différents éléments de réponse : direct repeat 3 (DR3), direct repeat 4 (DR4) et élément de réponse 6 (ER6). Il se lie aussi à l'élément de réponse 8 (ER-8) et à l'élément de réponse du « multi-drug receptor 2 » (MDR-2). Le PXR peut aussi activer la transcription de la sous-famille CYP2B en se liant à l'élément de réponse commun, le direct repeat 4 (DR4).

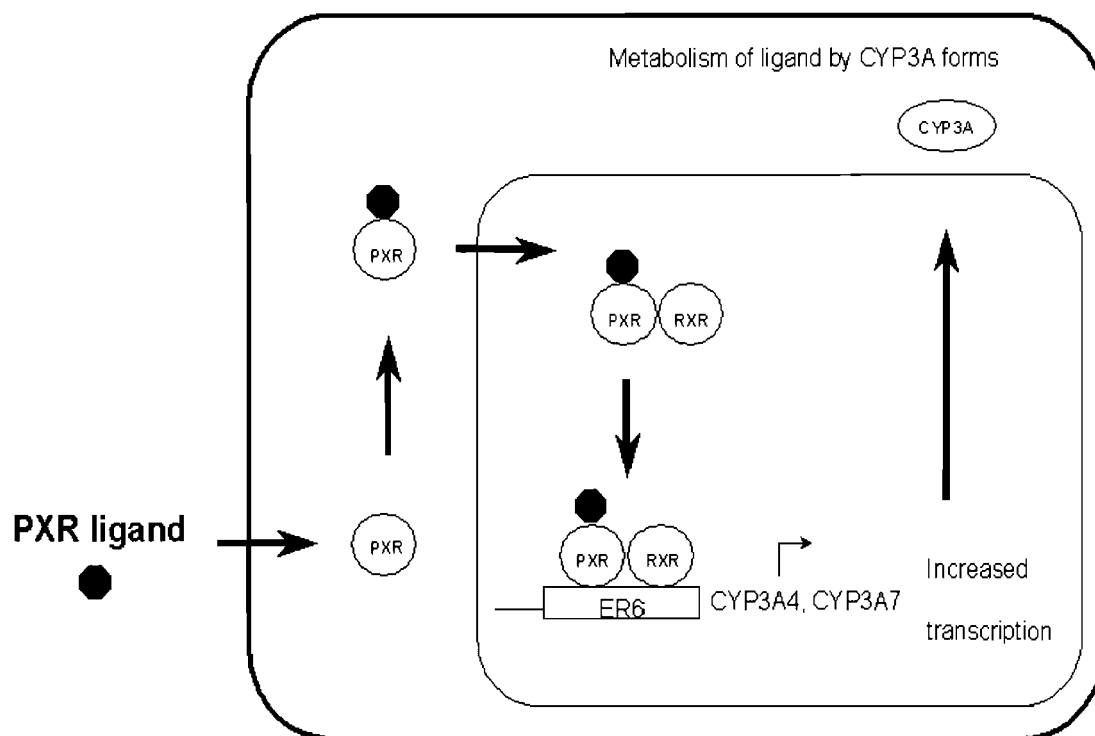


Figure 8. Voie d'activation de la transcription du CYP3A par PXR

Source : <http://herkules oulu.fi/isbn9514258649/html/x579.html>

1.7.1.2 Récepteur constitutif à l'androstane (CAR)

CAR est un récepteur nucléaire constitutivement actif, sans ligand, c'est pourquoi on le classe parmi les récepteurs « orphelins ». La liaison d'un ligand, comme l'androstane, va dissocier CAR des promoteurs et va inhiber la transcription des gènes (Barry et coll., 1998). Par un mécanisme plus conventionnel, d'autres ligands, comme le phénobarbital, peuvent induire la translocation nucléaire de CAR et permettent la transcription du gène. Il a été démontré qu'un inhibiteur de protéine phosphatase bloque la translocation nucléaire de CAR, induite par le phénobarbital. Ces résultats suggèrent que la localisation cellulaire de CAR est régulée par la phosphorylation et que le phénobarbital modifie la phosphorylation du récepteur afin de permettre la translocation de CAR au noyau (Kawamoto et coll., 1999).

Comme PXR, CAR s'hétérodimérise avec le RXR afin de se lier à l'élément de réponse au phénobarbital et induire l'expression de la sous-famille CYP2B. Comme illustré à la figure 9, le complexe CAR/RXR peut aussi se lier à l'élément de réponse aux xénobiotiques, à l'élément de réponse 6 (ER6) et à d'autres éléments de réponse. CAR se lie au direct-repeat 4 (DR4) à l'intérieur de PBREM (élément de réponse au phénobarbital) et il peut aussi se lier à DR3, DR5 et ER6. Le PBREM régule un bon nombre de sous-famille tel que CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2H, CYP3A, CYP6A et CYP102/106 (Sueyoshi et Negishi 2001).

Le PXR peut également se lier au DR4. Cette observation a permis d'affirmer que CAR et PXR contrôlent des fonctions communes. De plus, l'activation du GR

(récepteur aux glucocorticoïdes) par la dexaméthasone augmente l'expression de PXR et de CAR par GRE (élément de réponse aux glucocorticoïdes), ce qui a pour effet d'augmenter l'expression des CYP3A (Williams et coll., 2005).

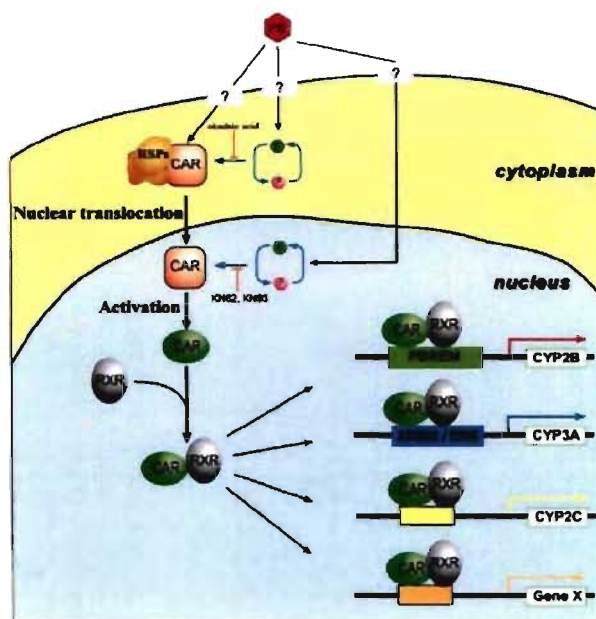


Figure 9. Voie d'activation de la transcription du CYP3A par CAR

Source: Zelko & Negishi, Biochem Biophys Res, 2000, 277:1-6

1.7.1.3 Peroxisome Proliferator Activated Receptor α (PPAR- α)

Les récepteurs activés des proliférateurs de peroxysomes (PPAR) participent principalement à l'augmentation de l'expression des enzymes impliqués dans l'oxydation d'acides gras comme l'acétyl-coA oxydase et la famille du CYP4 (Desvergne et Wahli, 1999). Le récepteur activé des proliférateurs de peroxysomes comprend trois isoformes, le PPAR α , le PPAR γ et le PPAR δ . Le PPAR α peut être activé par des acides gras saturés et polyinsaturés comme l'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique (Gottlicher et coll., 1992). Le

PPAR γ lie les acides gras polyinsaturés incluant l'acide linoléique, l'acide linoléique, l'acide arachidonique et l'acide éicosapentaénoïque, tandis que le PPAR δ lie les ligands du PPAR α et du PPAR γ (Xu et coll., 1999).

Les fibrates utilisés pour le traitement de l'hypertriglycéridémie sont des ligands des PPARs. Le clofibrate et le fenofibrate activent le PPAR α et le PPAR γ , tandis que le benzafibrate active les trois isoformes du PPAR (Willson et coll., 2000).

Parmi les substrats se liant aux PPAR, nous retrouvons aussi les thiazolidinediones. La liaison des thiazolidinediones aux PPARs permet l'induction de la différenciation des adipocytes (Kletzien et coll., 1992). Les thiazolidinediones, comme la troglitazone, la rosiglitazone et la pioglitazone sont utilisés dans le traitement du diabète de type 2 (Willson et coll., 2000).

Les PPARs, après hétérodimérisation avec RXR, se fixe à l'élément de réponse des proliférateurs de peroxyosomes de l'ADN.

Différents coactivateurs augmentent la transcription du gène du PPAR, tel le récepteur des stéroïdes (SRC-1), la protéine liant le PPAR (PBP) et plusieurs autres (Zhu et coll., 1996; Zhu et coll., 1997).

1.7.1.4 Récepteur des arylhydrocarbures

L'activation du récepteur des aryl-hydrocarbures (AhR) se fait par la liaison du ligand au récepteur. Les ligands du AhR sont les hydrocarbures aromatiques

halogénés, tels le TCDD (dioxine), le polychlorinate biphényle et le polychlorinate dibenzofurène, de même que les hydrocarbures polycycliques aromatiques, comme le benzo[a]pyrène et le 3-méthylcolanthrène (Poland et Knutson, 1982). La majorité des substrats du CYP1A1 activent la translocation nucléaire de l'AhR. Les ligands se lient au récepteur cytoplasmique AhR et le complexe ligand-AhR se libère des protéines chaperonnes pour migrer dans le noyau afin de former un nouveau complexe avec le Arnt (Ah récepteur nucléaire de translocation). Le ligand-dimère peut se fixer à plusieurs éléments de réponse aux xénobiotiques comme l'élément de réponse à la dioxine, l'élément de réponse aux xénobiotiques et l'élément de réponse aux arylhydrocarbures (Jones et coll., 1986; Fujisawa et coll., 1987; Denison et coll., 1988).

La dioxine et le benzo[a]pyrène se lient à AhR et induisent la transcription du CYP1A1. Une hausse de la quantité et de l'activité du CYP1A1 augmente la formation de métabolites mutagéniques et augmente le stress oxydatif cellulaire. En métabolisant la dioxine, le CYP1A1 produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui bloque le NFI (nuclear factor I/CCAAT transcription factor) empêchant la transcription du CYP1A1. Le complexe AhR-Arnt induit l'AhRR (AhR repressor) qui séquestre l'Arnt (Barouki et coll., 2001) (figure 10).

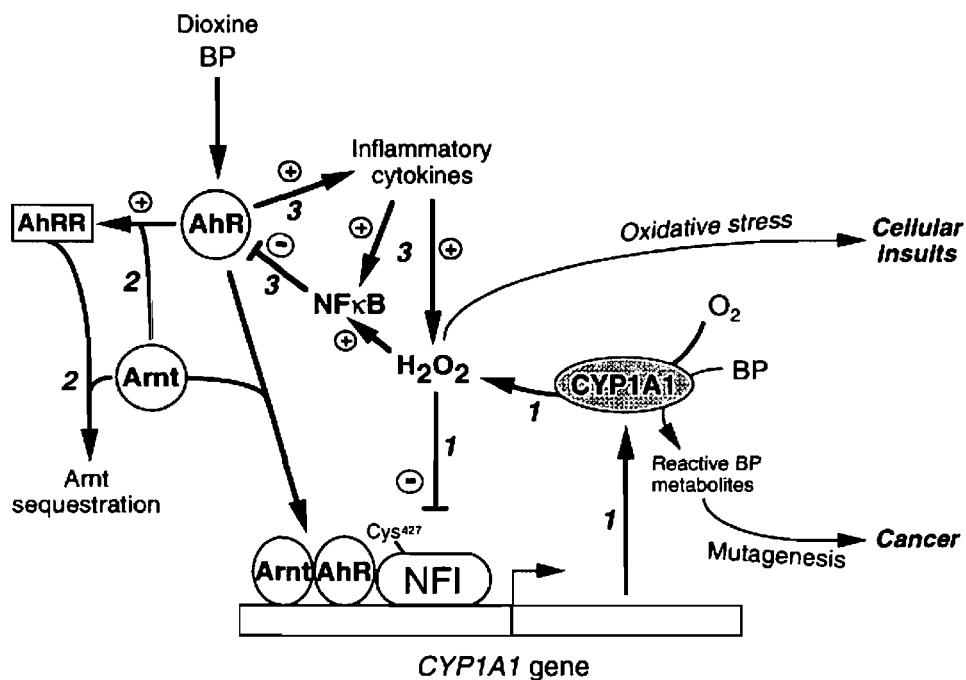


Figure 10. Activation et rétro-inhibition de la transcription du CYP1A
 Source : Barouki & Morel, *Biochem Pharmacol* 2001, 61 :511-6

1.7.2 Inhibition des CYP

L'inhibition des CYP peut s'effectuer de deux façons, soit par un effet direct sur l'enzyme ou soit par la diminution de l'expression. Le cycle catalytique des CYP peut être inhibé au niveau de quatre de ses paliers : lors de la liaison du substrat à l'hème, lors du transfert des électrons pour réduire le Fe³⁺, lors de la liaison de l'oxygène au Fe²⁺ et lors de l'oxydation du substrat. Les inhibiteurs qui interfèrent avec le cycle catalytique avant le processus d'oxydation sont de type réversible : compétitifs ou non-compétitifs. Les inhibiteurs agissant pendant ou après le transfert de l'oxygène sont de types irréversibles ou quasi-irréversibles. Les sections suivantes décrivent les types d'inhibitions et leurs mécanismes d'action.

1.7.2.1 Inhibition réversible du CYP

Les inhibiteurs réversibles compétitifs entrent en compétition avec les substrats pour la liaison à la poche lipophile du site actif, par exemple, l'étude *in vitro* de la biotransformation du benzène dans des microsomes de foie est inhibée en présence du toluène et vice-versa (Sato et Nakajima, 1979).

Un autre mécanisme d'inhibition réversible se produit lorsqu'un ligand se lie à l'atome de fer (Fe^{3+}) du groupement hème causant un changement dans le potentiel réduction/oxydation, rendant la réduction de l'enzyme par la NADPH-réductase plus difficile (Sligar et coll., 1979). Lorsque le monoxyde d'azote se lie à l'hème, il empêche la liaison de l'oxygène causant une inhibition réversible (Fujii et coll., 1997).

Parmi les inhibiteurs non-compétitifs, le monoxyde de carbone agit en se liant à l'atome de fer réduit, le Fe^{2+} du groupement hème des CYP réduit. Les dérivés triazoliques, la pyridine et l'imidazole peuvent se lier à la poche lipophile et au Fe^{3+} . L'hydrophobicité et la force de la liaison à l'hème, de ces substrats produit une inhibition non compétitive très efficace (Testa et Jennifer, 1981).

1.7.2.2 Inhibition irréversible du CYP

La biotransformation d'un substrat par les CYP peut conduire à la formation d'intermédiaires réactifs qui peuvent inactiver les CYP de façon irréversible ou quasi-irréversible. Il existe quatre classes de mécanismes d'inactivation irréversible.

Tout d'abord, certains agents se fixent de façon covalente à la protéine, tels les dérivés thiocarbonylés (Miller et coll., 1983), les dérivés halogénés (Halpert et Neal 1980) et les dérivés oléfiniques et acétylènes (Gan et coll., 1984; Helvig et coll., 1997).

Une deuxième classe d'inhibiteurs comprend les dérivés ayant une fonction dioxyméthylène (utilisé dans des insecticides), tel les arylamines, les alkyamines et les amines aromatiques (Correia et Ortiz de Montellano, 2005). La transformation de ces substrats par les CYP en composés intermédiaires leur permet de se fixer quasi-irréversiblement au Fe^{3+} de l'hème prosthétique.

Une troisième classe d'inhibiteurs inclue les agents qui se lient de façon covalente au groupe prosthétique hème et inactivent irréversiblement les CYP. Par exemple, l'époxydation des oléfines produit une N-alkylation de l'hème, réaction qui inactive le CY2B1 (De Montenallo et Mico, 1980).

Finalement, la dernière classe d'inhibiteurs inclue des agents qui dégradent le groupe prosthétique du hème ou qui dénaturent la protéine, comme par exemple, lors de l'oxydation du tétrachlorure de carbone et des spirolactones (Guzelian et Swisher, 1979; Deckers et coll., 1989). Ce mode d'inactivation est fréquent pour les CYP2C, CYP2E et surtout pour le CYP3A.

2. La NADPH-réductase

Dans les sections qui suivent, nous discuterons de la découverte de la NADPH-réductase, de sa structure, de son importance dans la biotransformation des médicaments ainsi que de sa régulation.

2.1 Historique de la NADPH-réductase

En 1950, Horecker a isolé une protéine impliquée dans la réduction du cytochrome *c*. Ce n'est qu'en 1962 qu'Omura et Sato ont observé que la NADPH-réductase est une hémoprotéine capable de réduire le CYP. En 1962, Williams et Kamin, ainsi que, Phillips et Langdon ont démontré que la NADPH-réductase est située majoritairement dans le foie, au niveau du réticulum endoplasmique et qu'elle participe au transport des électrons dans les microsomes.

Lors de la découverte de la NADPH-réductase, on croyait que ses cofacteurs (la flavine adénine dinucléotide, FAD et la flavine mono-nucléotide, FMN) étaient impliqués dans la réduction du cytochrome *c*. De plus, la protéine isolée de poids moléculaire de 68000 daltons, était capable de réduire quelques accepteurs d'électrons, mais elle était incapable de transférer ses électrons aux protéines microsomales comme au cytochrome *b₅* ou aux CYP. La présence de trypsine occasionnait la perte du groupement NH₂ terminal, essentiel à la liaison de la NADPH-réductase aux CYP et à la membrane, empêchant le transfert d'électrons. Peu de temps après, la NADPH-réductase a pu être isolé après la solubilisation des

microsomes du foie par des détergents qui permettent la liaison de la NADPH-réductase avec les CYP.

La NADPH-réductase a un poids moléculaire de 78000 daltons et contient une molécule de FAD et de FMN par protéine. Son véritable partenaire de réduction/oxydation a été découvert suite aux travaux de Lu et Coon, en 1968, qui ont permis d'affirmer que la NADPH-réductase est essentiel à la réduction du groupement hème des CYP.

Il existe quatre grandes classes d'enzymes basées sur le système de transfert des électrons : a) Protéines nécessitant une réductase avec un groupement flavine adénine dinucléotide (FAD) et un domaine Fe_2S_2 . b) Protéines nécessitant le cytochrome NADPH-réductase et/ou cytochrome b_5 avec un groupement flavine adénine dinucléotide ou flavone mononucléotide (FAD/FMN) pour le transfert d'électron comme le démontre la figure 11. c) Enzymes qui sont autosuffisantes et ne nécessitent aucun donneur d'électron. d) Enzymes recevant les électrons directement du NADPH.

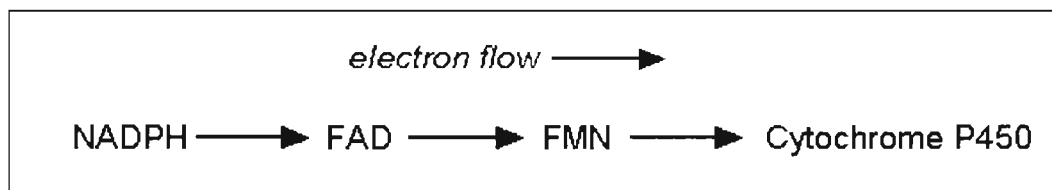


Figure 11. Transfert d'électron dans des CYP de la classe b)

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

Cette classification ne fait pas partie de la nomenclature actuelle des CYP (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Initialement, chaque isoenzymes était nommé selon ses propriétés spectrales, sa mobilité électrophorétique ou selon ses substrats.

La NADPH-réductase 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 quatre enzymes font parties de cette famille : la NADPH-réductase, la méthionine-réductase, la NR1 et l'oxyde nitrique synthétase (Paine et coll., 2005).

2.2 Structure de la NADPH-réductase

La NADPH-réductase est une protéine membranaire située sur le réticulum endoplasmique. Elle a une distribution variée dans l'organisme, similaire à celle du CYP. La NADPH-réductase est constituée de deux domaines flavines distincts : la FAD (flavine adénine dinucléotide) et la FMN (flavine mononucléotide). Le panneau a) de la figure 12, montre l'arrangement tridimensionnel de la protéine incluant les domaines de liaison de la FMN, de la FAD, du NADP⁺, ainsi que du domaine de connexion. Dans le panneau b), on peut voir l'arrangement des hélices alpha et des feuillets bêta ainsi qu'un diagramme linéaire démontrant l'arrangement des différents domaines de liaison (Wang et coll., 1997).

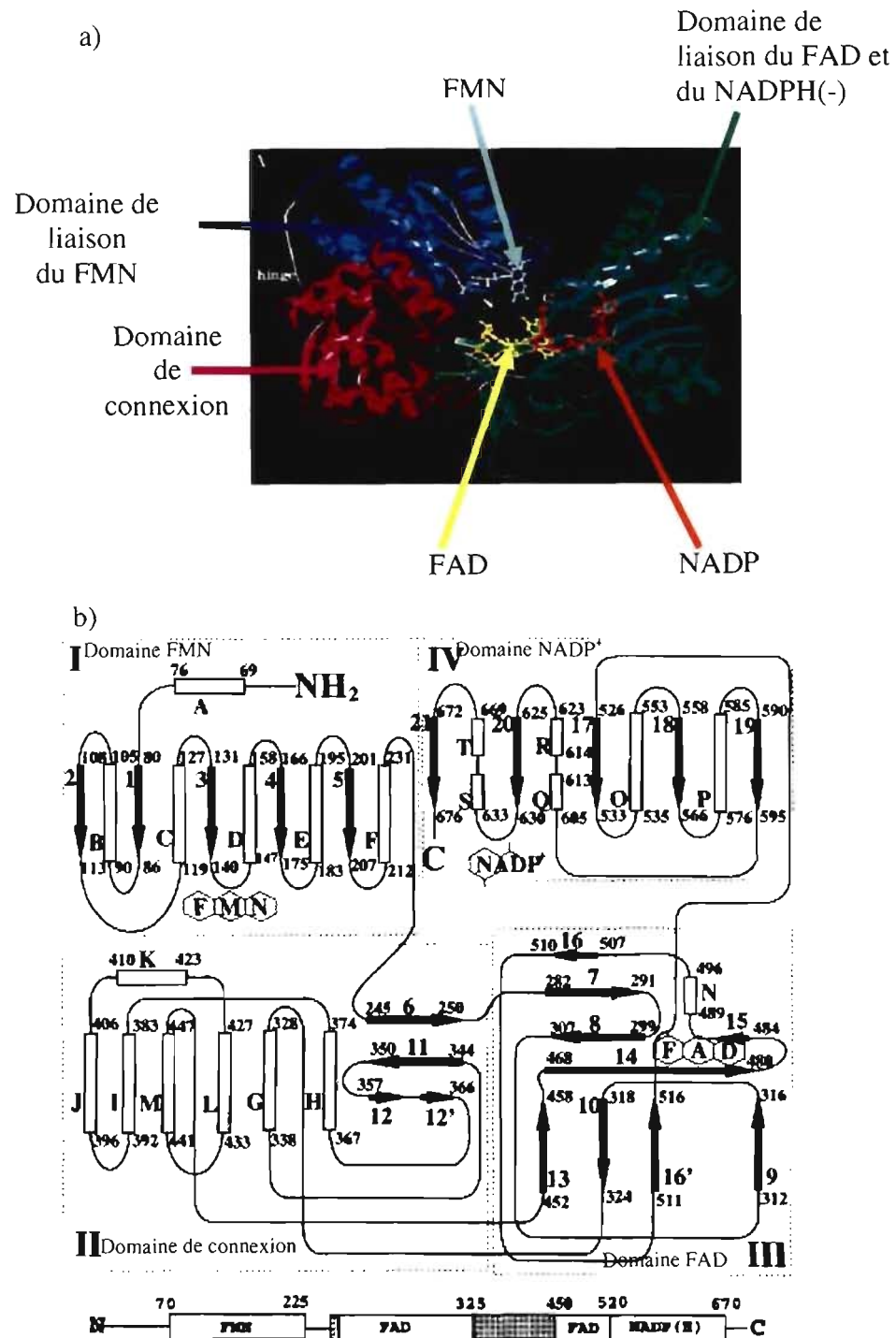


Figure 12. Structure de la NADPH-réductase

Source : Wang et coll., 1997

2.3 Rôle de la NADPH-réductase

Le rôle majeur de la NADPH-réductase est de transférer des électrons aux CYP. Pour permettre le passage de l'électron de la NADPH aux CYP, l'électron cédé par le NADPH est transféré au domaine FAD, accepteur d'électron. Ensuite, l'électron est transféré au domaine FMN. Le transfert d'électrons nécessite la formation d'un complexe NADPH-réductase/CYP dans un ratio de 1:1. L'orientation et la connexion des deux protéines se fait par des forces électrostatiques (par pairage de charges électrostatiques opposées), tandis que les forces hydrophobes permettent d'atteindre une proximité adéquate au transfert d'électrons (Tamburini et coll., 1986).

On ne peut pas traiter la NADPH-réductase comme un simple donneur d'électrons, son mécanisme d'action est beaucoup plus complexe. La réductase a neuf sous-formes différentes dépendant de la distribution des électrons à l'intérieur de la molécule et entre les flavines. La NADPH-réductase transfère deux électrons aux CYP. Iyanagi et coll. en 1978 et Vermillon et coll. En 1981 ont décrit le mécanisme de transfert d'électrons de la NADPH-réductase au CYP. Le mécanisme propose que la FAD et la FMN forment un cycle dans lequel ils passent d'une forme réduite à un électron à une forme réduite à trois électrons. La NADPH-réductase permet le transfert d'électron du NADPH au CYP en stabilisant la forme réduite à un électron de la FAD et de la FMN. La stabilisation de la FAD et de la FMN entraîne la formation de semiquinone $FADH\cdot$ et $FMNH\cdot$. Le mécanisme de transfert d'électrons est schématisé dans la figure 13.

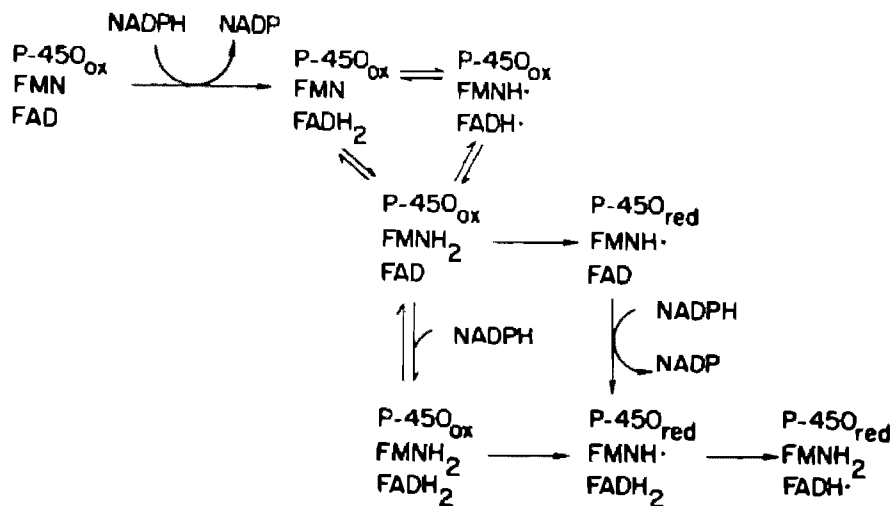


Figure 13. Mécanisme de transfert d'électrons de la NADPH-réductase au CYP

Source : Vermillon et coll., 1981

La NADPH-réductase permet l'apport d'électrons à deux endroits spécifiques dans le cycle : un pour réduire le fer (Fe^{3+} à Fe^{2+}) et l'autre pour activer l'oxygène formant le superoxyde (O^{2-}).

En plus de participer à la réduction des CYP, la NADPH-réductase est impliquée dans des nitroréductions, des azoréductions, dans des mécanismes impliquant l'action du cytochrome b_5 comme la désaturation du stéaryle CoA, la désaturation des phospholipides, l'élongation des acides gras, etc. (Backes et coll., 1993).

2.4 Régulation de la NADPH-réductase

Des études ont démontrées que bien que le phénobarbital induit l'expression de la NADPH-réductase, le niveau d'induction est nettement inférieur à celui atteint par les CYP après leurs inductions (Gonzalez et coll., 1980). L'expression de la

NADPH-réductase est régulée par l'axe hypophyso-thyroïdienne. Son expression dans le foie et dans les glandes surrénales est régulée par la triiodothyronine et par l'hormone corticotrope, respectivement (Ram et Waxman, 1992).

Les souris knock-out pour le gène de la NADPH-réductase hépatique sont viables. Bien que la mutation du gène de la NADPH-réductase cause la mort embryogénique, la délétion de cette enzyme au niveau du foie entraîne une perte de fonction des CYP hépatiques mais permet à l'organisme de se développer (Otto et coll., 2003).

Tout récemment, il a été démontré que les PPAR induisent une augmentation du niveau de transcription du gène de la NADPH-réductase dans le foie et le rein. L'exposition des rats à des proliférateurs de peroxyosomes comme le Wy-14,643 (acide acétique [4-chloro-6-(2,3-xylidino)pyrimidynylthiol]) et le di-*n*-butyl phthalate, entraîne l'augmentation de l'ARN messager de la NADPH-réductase dans le foie tandis que l'exposition au Wy-14,643 et au gemfibrozile mais pas au di-*n*-butyl phthalate, entraîne une diminution de l'expression de la NADPH-réductase (Fan et coll., 2003).

3. Inflammation

Au cours des années, de nombreux cas d'intoxication ou d'effets secondaires causés par des médicaments ont été répertoriés. Le premier cas a été rapporté par l'équipe de Samaras et Dietz en 1953; ces auteurs ont démontré que le bleu de trypan prolonge le temps d'anesthésie chez le rat (Samaras et Dietz, 1953).

En 1978, une étude a démontré que la demi-vie de la théophylline est augmentée chez les enfants présentant une infection par le virus de l'*Influenza* ou une infection à l'adénovirus (Chang et coll., 1978). Renton propose que la diminution de la demi-vie de la théophylline soit reliée à la baisse de son métabolisme causé par la diminution des niveaux de CYP (Renton, et coll., 1980). Indépendamment de la nature de l'inflammation, soit par une infection bactérienne (Sonne et coll., 1985), un choc septique (Shelly et coll., 1987), le vaccin contre l'influenza (Renton et coll., 1980) ou le vaccin contre la tuberculose BCG (Gray et Renton, 1983), la réaction inflammatoire diminue la clairance de l'antipyrine, du midazolame et de la théophylline.

Au cours des dernières années, il a été démontré que la réaction inflammatoire produit un changement d'activité et d'expression des CYP (Morgan et coll., 2001). Expérimentalement, l'administration de lipopolysaccharide (LPS) ou de térébenthine chez des rats diminue l'expression des CYP (Morgan et coll., 1997). Chez les lapins, l'injection de térébenthine cause une diminution de 50% de la clairance de la tolbutamine associée à une diminution de la concentration des CYP du foie (Parent et coll., 1992). Chez des volontaires sains, le LPS cause une diminution de la clairance de l'antipyrine, de l'hexobarbital et de la théophylline (Shedlofsky, 1994). Le LPS et la térébenthine sont des agents qui stimulent les différentes composantes cellulaires de la réponse inflammatoire (monocytes, macrophages, neutrophiles et cytokines).

3.1 Réaction Inflammatoire

Afin de mieux comprendre la modulation du CYP par la réaction inflammatoire, la prochaine section décrit les phénomènes impliqués lors de la réaction inflammatoire.

3.1.1 Phénomènes enclenchés lors de l'inflammation

L'inflammation est une réaction du système immunitaire enclenchée par une agression physique ou chimique. L'inflammation est caractérisée par des réactions systémiques affectant la synthèse des protéines plasmatiques, les systèmes endocrinien et hématologique. Ces réactions sont divisées en réponse localisée et réponse systémique.

La réponse localisée de la réaction inflammatoire se reconnaît par 4 signes cardinaux : la rougeur, la douleur, la chaleur et l'œdème. Dans les quelques heures suivant le dommage tissulaire, trois processus sont enclenchés a) un changement de la circulation sanguine, la dilatation des artérioles, des capillaires et des veinules, b) une augmentation de la perméabilité vasculaire et c) une extravasation des leucocytes du sang aux tissus.

La réponse systémique comprend l'augmentation de la synthèse d'hormones, dont l'ACTH et l'hydrocortisone, et d'un grand nombre de protéines de la phase aiguë dans le foie, dont la protéine C réactive. Les cytokines jouent un rôle important dans la phase systémique de la réponse inflammatoire aiguë. L'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α induisent une production de protéines de phase aiguë par les hépatocytes. Durant

cette phase, l'expression des protéines subit un changement très rapide d'environ 25%, soit une diminution ou une augmentation de leur synthèse. Par exemple, la synthèse de la céruloplasmine augmente d'environ 50%, celle de l'alpha-1-glycoprotéine augmente de deux à quatre fois sa production normale, tandis que la quantité d'albumine et de la transthyréline diminuent (Kushner et Rzewnicki, 1999).

3.1.2 Composantes cellulaires de l'inflammation

Le processus inflammatoire est généralement déclenché par l'activation de cellules inflammatoires comme les macrophages et les neutrophiles qui libèrent des cytokines, des protéines de phase aiguë ainsi que des hormones (Renton et coll., 2001). Dans la section suivante, nous décrivons les principaux types de cellules impliquées dans l'inflammation et leurs rôles.

La prolifération et la maturation des neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) se produisent dans la moelle osseuse et ils comptent pour 55 à 60% de la production cellulaire de la moelle osseuse. Suite à leur maturation, les neutrophiles font partie de la réserve cellulaire pour une durée de 5 jours. Ils sont ensuite relâchés dans le sang où ils circulent pendant 10 heures, leur durée de vie est d'environ un à deux jours (Bainton, 1999). Les neutrophiles polymorphonucléaires sont les premières cellules à être recrutées au site d'inflammation afin de permettre une phagocytose rapide.

Les éosinophiles constituent 3% des leucocytes. Une fois activés, les éosinophiles migrent immédiatement vers un stimulus attractant grâce à leur propriété de chimiotaxie. Les éosinophiles vont expulser le contenu de leurs granules cytotoxiques et produire des dérivés radicalaires de l'oxygène, tels des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène (Klebanoff et coll., 1999).

Une autre composante cellulaire essentielle au développement de la réponse inflammatoire est la présence de macrophages. Les macrophages sont distribués à travers le corps, dans la peau, les poumons, le foie, l'intestin, au niveau du système nerveux, dans le système hématopoïétique et dans le système lymphoïque, même en absence de réaction inflammatoire. Lorsque les macrophages détectent une anomalie, ils activent l'endothélium pour favoriser la mobilisation des neutrophiles polymorphonucléaires et produire des chimiokines, des cytokines (IL-6, IL-1 et le TNF- α , IL-10 et IL-12), ainsi que les différents médiateurs lipidiques impliqués dans l'inflammation (Gordon et coll., 1999). Lors de la réaction inflammatoire, l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α et l'IFN- γ sont les principales cytokines effectrices présentant des effets redondants et pleïotropiques. Les effets des cytokines sont de produire la fièvre, de synthétiser les protéines de phase aiguë par le foie, d'augmenter la perméabilité vasculaire, d'induire les chémokines ainsi que d'activer les cellules T et B (Goldsby et coll., 2001).

La réaction inflammatoire fait aussi intervenir les plaquettes qui sécrètent des substances chimiotactiques qui facilitent l'attachement des leucocytes à

l'endothélium, favorisant leur extravasation. (Klinger, 1997) Les mastocytes et les basophiles synthétisent et emmagasinent l'histamine, des cytokines dont l'IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-SCF et INF γ et des protéases. L'histamine permet la vasodilatation et augmente la perméabilité vasculaire (Nilsson et coll., 1999).

Les ROS générés lors de la réaction inflammatoire peuvent être des composés hydroxyle (OH \cdot), alkoxy (RO \cdot), peroxy (ROO \cdot), superoxyde (O $_2^{\cdot-}$), nitroxy (NO \cdot), peroxyde (H $_2$ O $_2$), hydroperoxydes (ROOH) et de l'acide hypochlorique (HOCl) (Simon, 2000).

3.2 Réaction Inflammatoire et CYP

Que ce soit par la présence d'une infection ou par l'induction de l'inflammation septique par la térébenthine, la diminution de l'expression des CYP est causé par la relâche de médiateurs sériques. Généralement, la réponse du foie à l'inflammation ou à l'infection se traduit par une augmentation de la production de protéines de phase aiguë (PPA). Le processus inflammatoire est principalement régulé par l'IL-6, interagissant avec l'IL-1 et le TNF- α (Baumann et Gauldie, 1990). La réponse aiguë à l'inflammation 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 la libération d'IL-1 et d'IL-6 par les cellules endothéliales et les fibroblastes (Baumann et Gauldie, 1994).

Lorsqu'un animal reçoit du LPS bactérien, le TNF- α est sécrété par des monocytes et des macrophages. Le TNF- α stimule la libération d'IL-1 et ensemble, l'IL-1 et le TNF- α vont stimuler la libération d'IL-6 et d'INF- γ (Lowry, 1993).

La production d'IFN- α et d'INF- β par les leucocytes, les lymphoblastes et les fibroblastes est augmentée lors d'une infection virale. L'INF- γ est relâché par les cellules T et il peut mimer les effets de l'infection virale sur les CYP (Mannering et Deboria, 1986).

Les médiateurs sériques produits lors d'une réaction inflammatoire sont responsables de la diminution de l'expression du CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2 et CYP3A2 chez le rat (Prandota, 2005). Chez le lapin ayant une réaction inflammatoire suite à une injection de térébenthine, des médiateurs sont évacués dans le sérum et conduisent à l'inactivation et à la diminution de la quantité de CYP total (El-Kadi et coll., 1997).

L'expression et la quantité d'ARN messager du CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 sont diminuées lors de la réaction inflammatoire chez le lapin. Lorsque les hépatocytes d'un lapin sont incubés pendant 48h avec du sérum provenant d'humain ayant une infection virale, l'IL-6 et l'INF- γ ont été identifiés comme étant responsables de l'inactivation des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 (Bleau et coll., 2003). Lorsque les hépatocytes d'un lapin sont incubés pendant 48h avec du sérum provenant d'un lapin ayant une réaction inflammatoire, l'IL-1 et l'IL-6 ont été identifiés comme étant

responsables de l'inactivation des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 chez le lapin (Bleau et coll., 2003).

Les voies de signalisation conduisant à la régulation négative des CYP n'ont pas encore été clairement caractérisées. Il a été démontré que la diminution d'expression des CYP1A2, CYP2A5, CYP2C29, CYP2E1, CYP3A11, CYP4A10, et CYP4A14 par les différentes cytokines chez les souris normales est semblable à celle observée chez les souris knock-out pour le PXR et pour le PPAR, ce qui suggère que la régulation négative des CYP n'est pas dépendante de la présence du PPAR α et du PXR (Richardson et Morgan, 2005). L'expression du CYP3A6 est régulée par le PXR et il a été démontré que le traitement au LPS réduit l'ARN messager du PXR et que l'activation du NF- κ B bloque l'activation du PXR (Gu et coll., 2006).

Plusieurs autres voies de signalisations sont impliquées dans la modulation du CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire. Les sections suivantes décrivent les différentes protéines kinases ayant un rôle dans la modulation du CYP3A6.

3.2.1 Protéine kinase C

La famille des protéines kinases C comprend une dizaine d'isoformes qui se divisent en trois sous-familles distinctes : classique (s α , β I, β II, et γ), non-conventionnel (δ , ϵ , η , et θ), et atypique (ζ et ι / λ), basées selon leur second messenger. La famille classique a besoin du Ca^{2+} , du diacylglycérol (DAG) et de phospholipide pour son activation. Les PKC dit non-conventionnels ont besoin de DAG, mais ne nécessitent pas de Ca^{2+} pour leur activation. L'activation de la sous-famille atypique n'a pas

besoin de Ca^{2+} ni de diacylglycérole (Webb et coll., 2000). Les isoformes de la PKC et les effecteurs impliqués dans son activation jouent des rôles dans la régulation cellulaire, la survie cellulaire et l'apoptose (Griner et Kazanietz, 2007).

Le bisindolylmaléimide IV est un inhibiteur de la PKC ayant un IC_{50} de 87 ηM , et un IC_{50} de 2,7 μM pour inhiber la PKA (Calbiochem).

Les études d'Ikegwuonu et coll. suggèrent que la voie de la PKC participe à la régulation du CYP1B1 (Ikegwuonu et coll., 1999). La diminution de l'activité des CYP1A1, CYP1A2 et 3A6 par le sérum et par l'IL-6 implique l'activation de protéines tyrosine kinases, de la p42/44 MAPK et de la PKC (Levitchi et coll., 2006). L'activation de la PKC inhibe l'activité du PXR, qui régule l'expression du CYP3A (Ding et Staudinger, 2005)

3.2.2 Kinase de régulation extracellulaire : Erk (P42/44 MAPK)

Les « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) forment une famille de protéines kinases très conservée chez les eucaryotes. Les MAPK sont impliquées dans divers processus cellulaires dont la croissance, la migration, la différenciation et le développement cellulaire (Krens et coll., 2006). La première voie des MAP kinases découverte est celle de la famille des ERK (extracellular signal-regulated kinases). Comme le montre la figure 14, les MAP kinases sont impliquées dans la prolifération cellulaire induite par les facteurs de croissance qui agissent via un récepteur couplé à une protéine G ou à un récepteur tyrosine-kinase (Cooper et coll., 2004).

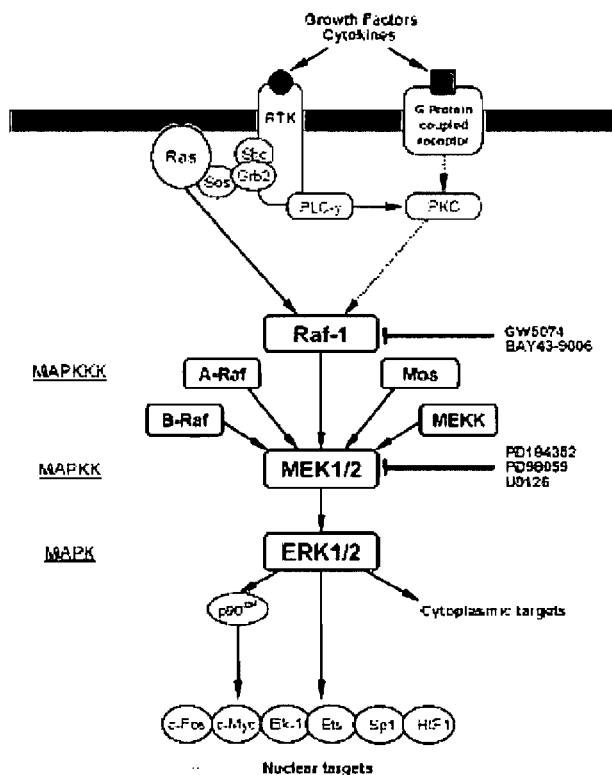


Figure 14. Voie de signalisation d'ERK

Source : Kohno et Pouyssegur, 2003

Le PD098059 est un inhibiteur de la MAP kinase kinase (MAPK/ERK kinase ou MEK), il inhibe la phosphorylation de MEK par son interaction avec la MAPKK avec un IC_{50} entre 1 et 20 μ M (Alessi et coll., 1995)

Il a été démontré que les ERK 1/2 jouent un rôle dans la régulation négative des CYP2B et CYP3A, lors de l'induction par le phénobarbital chez le rat (Joannard et coll., 2000). Par ailleurs, comme mentionner ci-haut, la diminution de l'activité des CYP lors de la réaction inflammatoire implique l'activation de la voie du ERK 1/2 et de la PKC (Levitchi et coll., 2004).

3.2.3 Protéine kinase activée par les mitogènes : p38 MAPK

Les MAP kinases contrôlent la prolifération, la différenciation, la mort cellulaire et les processus inflammatoires grâce aux voies de signalisation dans lesquelles ERK, JNK (kinase Jun N-terminal) et p38 MAPK sont impliquées. JNK et p38 MAPK sont surtout activées en réponse aux cytokines inflammatoire et au stress cellulaire régulant ainsi la réaction inflammatoire et la mort cellulaire. Trois protéines kinases sont activées lors de la cascade de signalisation : la MAPKKK, qui active la MAPKK, qui stimule une MAPK (Cooper et coll., 2004).

Le SB0203580 inhibe la p38 MAPK avec des valeurs d'IC₅₀ entre 0,3 et 0,6 µM (Lahti et coll., 2002).

L'induction des CYP par le phénobarbital active ERK, JNK et p38 MAPK (Joannard et coll., 2006). L'inhibition de la voie des JNK ne produit aucun effet sur l'induction des CYP2B1 et CYP2B2 par le phénobarbital tandis que l'inhibition de la voie des ERK et de la voie du p38 MAPK inhibe et induit l'expression de ces isoformes, respectivement (Joannard et coll., 2006). L'inhibition de la voie du p38 MAPK peut aussi moduler la réaction inflammatoire en bloquant l'effet des différentes cytokines (Parasrampur et coll., 2003). Des résultats préliminaires suggèrent que l'inhibition de la voie du p38 MAPK par le SB203580 augmente l'activité du CYP3A6 attestant la participation de la voie du p38 dans la régulation de cet isoforme (Kourylko et coll., 2006).

3.2.4 Phosphatidylinositide 3-kinase

Une autre des voies de signalisation implique la participation des phospholipides membranaires, plus particulièrement la phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), pour la formation de seconds messagers. Plusieurs hormones et facteurs de croissance stimulent l'hydrolyse de la PIP₂ par la phospholipase C libérant le diacylglycérole (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) qui activent les voies de la PKC et de la mobilisation du Ca²⁺, respectivement. La PIP₂ peut aussi être phosphorylée par la phosphatidylinositide 3-kinase (PI₃K) ce qui forme la phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃). Les récepteurs couplés à une protéine G ou les récepteurs tyrosine kinase peuvent activer la voie des PI₃K. La protéine sérine/thréonine kinase Akt est activée par la PIP₃ et elle est majoritairement impliquée dans la signalisation de survie cellulaire, phénomène illustré dans la figure 15 (Cooper et Hausman, 2004).

Le LY294002 et la wortmannine sont des inhibiteurs de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI₃K); les IC₅₀ du LY294002 et de la wortmannine sont de 1,4 µM et de 2-4 nM, respectivement (Vlahos et coll., 1994; Powis et coll., 1994).

Il a été démontrée avec le modèle d'inflammation par la carraghénane chez les rats, que l'inhibition de la voie du PI₃K diminue la phosphorylation d'Akt et bloque l'infiltration de neutrophiles lors de la phase aiguë de l'inflammation (Ferrandi et coll., 2007).

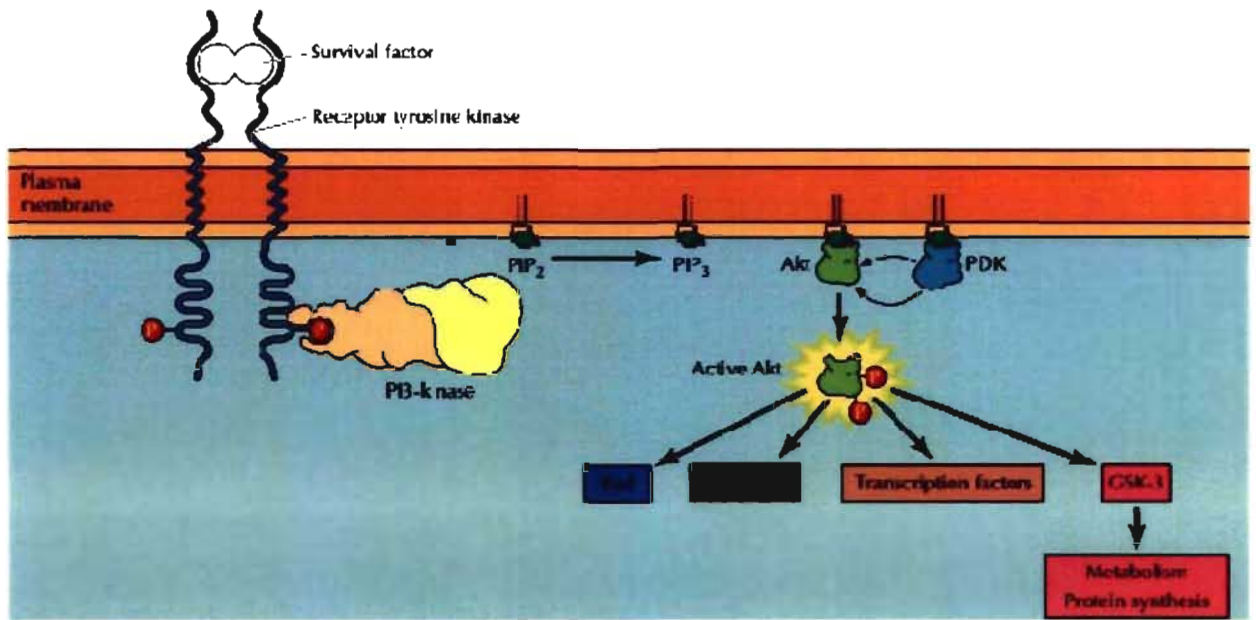


Figure 15. Activation de la PI₃K

Source : Cooper, 2000

3.2.5 Janus kinase/Protéines transductrices de signal et activatrices de transcription

Les protéines transductrices de signal et activatrices de transcription (STAT) ont été découvertes lors de l'étude de la signalisation des récepteurs aux cytokines. La stimulation des récepteurs aux cytokines permet l'activation des protéines STAT présentes dans le cytoplasme. Une fois associées au récepteur, les protéines STAT sont phosphorylées par des membres de la famille de Janus kinase (JAK), associés aux récepteurs des cytokines. La phosphorylation des protéines STAT permet leur dimérisation et induit leur translocation au noyau, où elles stimulent la transcription génique (Ihle et coll., 1994).

Le picéatannol est un inhibiteur de STAT3 et de STAT5, mais il n'inhibe pas la phosphorylation de STAT1 et STAT2. L'inhibition de la phosphorylation de STAT3 et STAT5 entraîne l'inhibition de la phosphorylation de JAK1 (Su et David, 2000).

La liaison d'IL-6 à son récepteur induit la dimérisation du gp130. Ce dimère permet l'activation de JAK et la phosphorylation de gp130, phénomène qui active la cascade de STAT1, de STAT3 et des MAPK (Boulton et coll., 1995).

3.2.6 Protéines Phosphatases

Afin de mieux comprendre le rôle des protéines phosphatases, la section suivante décrit les différentes classes de protéines phosphatases ainsi que leurs rôles.

À l'opposé des protéines kinases, les protéines phosphatases sont des enzymes qui hydrolysent la liaison d'un phosphate monoesters aux phosphosérines, phosphothréonines, phosphotyrosines et de l'acide phosphoaspartique. Inversement, les protéines kinases sont des enzymes capables de lier un groupement phosphate à leurs substrats en utilisant l'énergie venant de la dégradation des molécules d'ATP, phénomène illustré à la figure 16.

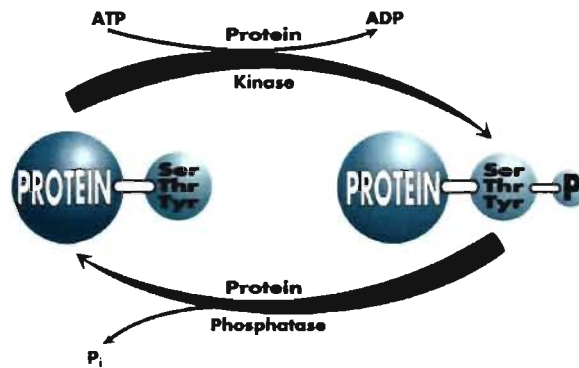


Figure 16. Action des protéines kinases et des phosphatases
Source : <http://www.emdbiosciences.com>

Les protéines phosphatases sont classifiées en trois classes distinctes : spécifiques aux résidus serine/thréonine, spécifiques aux résidus tyrosine ou les phosphatases ayant les deux spécificités. Voici un tableau résumant les différents sous-types de protéines phosphatase :

Classe	Exemple	Substrat
Tyrosine-spécifique phosphatases	PTP1B	Phospho-Tyrosine
Sérine/Thréonine spécifique phosphatases*	PP2C	Phospho-Sérine/Thréonine
Double Spécificité Phosphatases	VHR	Phospho-Tyrosine/Sérine/Thréonine
Histidine Phosphatase	PHP	Phospho-Histidine
Lipide Phosphatase	PTEN	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Triphosphate

Tableau 2. Différentes classes de protéines phosphatases et leurs substrats.

*La classe de Sérine/Thréonine comprend les protéines phosphatase 1(α , β , γ 1, γ 2), 2A, 2B, 2C, 4 et 5. Tableau de wikipedia : <http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphatase>

La protéine phosphatase 1 (PP1) est une protéine phosphatase sérine/thréonine spécifique, dépendante du Mn^{2+} . La PP1 est présente dans le noyau et le cytosol et peut être inhibée par la calyculine A avec un IC_{50} de 2 ηM et par l'acide okadaïque dont l' IC_{50} varie entre 60 et 500 ηM . La protéine phosphatase 2 est présente dans le cytosol, le noyau ainsi que dans les mitochondries et peut aussi être inhibée par la calyculine A et l'acide okadaïque avec des IC_{50} de 0,5 à 1 ηM (Ishihara et coll., 1989).

3.3 Réaction Inflammatoire et NADPH-réductase

Peu d'information concernant la régulation de la NADPH-réductase lors de la réaction inflammatoire n'est disponible.

Morgan et coll. ont publié une étude démontrant que l'injection de LPS diminue l'activité et l'expression de la NADPH-réductase et du cytochrome b_5 (Morgan et coll., 1989). Cependant, lorsque l'équipe de Morgan a utilisé la térébenthine pour induire l'inflammation, l'activité de la NADPH-réductase n'était pas affectée. D'après les résultats publiés, la réaction inflammatoire produite par l'injection de térébenthine diminue l'expression des CYP plus lentement que la diminution produite par l'administration de LPS.

Takashi et coll. ont aussi démontré que l'injection de LPS réduit l'activité de la NADPH-réductase, mais leur étude démontre que l'acide ascorbique, contrairement à l'effet bénéfique sur l'expression des CYP, n'a pas d'effet sur la diminution de

l'activité de la NADPH-réductase par l'injection de LPS chez les poulets (Takashi et coll., 1997).

Une autre étude démontre que la diminution du contenu en NADPH-réductase lors d'injection au LPS est prévenue par la N-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME), mais n'est pas affecté par la mélatonine (Sewerynek et coll., 1995).

Le gène de la NADPH-réductase est régulé par l'axe hypophyso-thyroïdienne et par l'hormone hypophysaire triiodothyronine (T3). Il a été démontré que l'hypophysectomie diminue l'expression de l'hormone thyroïdienne et diminue de plus de 50% les niveaux de NADPH-réductase dans le foie (Waxman et coll., 1989). Feingold et coll. ont démontré que l'administration de LPS diminue l'expression du récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR) et des PPAR, deux récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation de la NADPH-réductase (Feingold et coll., 2004).

De par l'étroite liaison de la NADPH-réductase avec les CYP, il est probable que les mécanismes impliqués dans la régulation des CYP lors de la réaction inflammatoire influencent aussi la NADPH-réductase. Notre projet vise à étudier l'importance de l'activité de la NADPH-réductase lors de la modulation du CYP3A6 par la réaction inflammatoire.

B. Matériels et méthodes

1. Isolement des hépatocytes

Des lapins mâles de race New-Zealand (2-2,5Kg) provenant de la ferme Charles Rivers (Saint-Constant, Québec) sont gardés dans des cages séparées et nourris avec du Purina Laboratory Chow et de l'eau *ad libitum* pendant au moins sept jours avant l'expérimentation.

La réaction inflammatoire est provoquée par l'injection sous-cutanée de térébenthine (2,5 ml des deux cotés du dos). Quarante-huit heures après l'injection de térébenthine, les animaux présentent une réaction inflammatoire aiguë caractérisée par l'augmentation de la température rectale, par la perte de poids et par la diminution de l'appétit. La température rectale des lapins ayant reçu de la térébenthine est de $41,4 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$, comparé à $38,6 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ chez les lapins témoins ($p < 0,001$).

Les lapins sont ensuite mis à jeun vingt-quatre heures avant l'isolement des hépatocytes. Quarante-huit heures après l'injection de térébenthine, environ 30 ml de sang sont prélevés de l'artère centrale de l'oreille, par la suite le lapin est 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). Brièvement, après avoir anesthésié les lapins avec 30 ml/kg de penthiobarbital, une laparotomie est effectuée afin de cathétériser la veine porte et la veine cave. Le foie est perfusé premièrement avec 800 ml d'une solution de lavage contenant 115 mM

de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de KH_2PO_4 , 25 mM de HEPES, 0,5 mM d'EGTA, 5,5 mM de glucose et 0,067 mg/ml d'héparine. Par la suite, le foie est perfusé avec une solution de 400 ml de collagénase 0.013% servant à la digestion des membranes cellulaires et contenant 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. Les perfusions sont faites à l'aide d'une pompe péristaltique et les solutions sont maintenues à 37°C avec un barbotage constant afin de saturer la solution d'oxygène (O_2) à 95%.

Lorsque le liquide perfusé parvient à diffuser à travers la membrane externe du foie, les cellules sont séparées en peignant le foie avec un peigne en plastique. Le mélange obtenu est filtré à travers une membrane en nylon d'un diamètre de 230 μm ; le filtrat est déposé en barbotant à 37°C avec de l'oxygène pendant 15 minutes. Les cellules sont alors filtrées une seconde fois à travers un filtre de nylon de 80 μm . La suspension d'hépatocytes est divisée en quatre parties égales et mise sur de la glace pilée à 4°C. Un volume égal de milieu de culture, au volume de cellules recueillies, est ajouté à chaque tube et ceux-ci sont centrifugés à 340 rpm pendant trois minutes. Le surnageant est ensuite aspiré, le culot re-suspendu dans du milieu de culture et les hépatocytes sont centrifugés pendant trois minutes à 340 rpm. Ce processus est répété à deux reprises.

Après les centrifugations, les hépatocytes morts sont séparés des vivants par une centrifugation dans un gradient de percoll à 3850 rpm pendant vingt minutes. La

viabilité des hépatocytes est attestée par la coloration des cellules mortes au bleu de trypan; les hépatocytes sont mis en culture lorsque la viabilité est supérieure à 90%.

Les hépatocytes sont ensuite dilués à une concentration de 10^6 cellules/ml dans du milieu de culture Williams Medium E (WME) auquel est rajouté 10% de sérum de veau et 1% de streptomycine/pénicilline ainsi que $1 \mu\text{M}$ d'insuline. Les hépatocytes sont mis en culture et déposés dans les puits des plaques. Afin de mesurer l'expression des CYP, les hépatocytes sont déposées dans des plaques à six puits traitées au collagène à la concentration de 3×10^6 cellules par puits. Pour les mesures d'activité enzymatique, $0,5 \times 10^6$ cellules par puits sont déposées dans des plaques à 24 puits traitées au collagène.

Une fois les hépatocytes déposés dans les plaques, celles-ci sont incubées pendant une heure afin de permettre l'adhérence des cellules à la matrice de collagène dans le fond des puits. Le milieu de culture est changé pour éliminer les cellules mortes et les inhibiteurs sont ajoutés dans le milieu de culture.

2. Mesure de l'activité du CYP3A6

Le surnageant est aspiré et les hépatocytes sont rincées deux fois avec $300 \mu\text{L}$ d'une solution de Krebs. Ensuite, $300 \mu\text{L}$ d'une solution contenant $60 \mu\text{M}$ de la sonde : 3,4-difluorobenzoyloxy-5,5-diméthyl-4-(4-méthylsulfonyl phényl)-(5H)-furan-2-one (DFB) est déposée dans chaque puits. Le DFB, un substrat du CYP3A non fluorescent est transformé en 3-hydroxy-4-(4-méthylsulfonyl phényl)-(5H)-furan-2-

one (DFH), un métabolite fluorescent (Chauret et coll., 1999). Suite à 20 minutes d'incubation à 37°C, 100 µL de surnageant sont prélevés et transférés dans une plaque de 96 puits contenant 100 µL d'une solution de tampon tris/acétonitrile (0,05 M/40%). La fluorescence du DFB est mesurée par fluorométrie (excitation de 360 nm et émission de 440 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques à fluorescence (Victor2, 1420 Multilabel counter, PerkinElmer Wallac, Gaithersburg, MD). Le DFB est dilué dans de l'acétonitrile et conservé dans une solution mère de 10 mM à 2°C.

3. Mesure de l'activité de la NADPH-réductase

L'essai enzymatique a lieu à la température de la pièce dans un tampon phosphate de Sorensen's à pH 7.8. Basée sur la colorimétrie de la réaction, l'essai évalue la réduction du cytochrome c oxydase en cytochrome c réductase en présence de NADPH. La transformation du cytochrome c émet une bande avec une absorbance à 550 nm. Cette réaction est faite par la NADPH-réductase contenue dans les hépatocytes. Nous obtenons la quantité d'unité réduite par minute par mL contenue dans nos échantillons par le calcul suivant :

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

La réaction est lue après une minute, 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 Kamin, 1967).

4. Expression du CYP3A6 et de la NADPH-réductase

L'expression de l'isoforme CYP3A6 ainsi que de la NADPH-réductase sont mesurées par immunobuvardage de type western (Western blot). Après incubation, les hépatocytes sont instantanément gelés par immersion dans de l'azote liquide et conservées à -80°C. Le jour de l'analyse, la concentration de protéines dans les échantillons est évaluée par la technique de l'acide bicinchoninique (BCA). Pour quantifier le CYP3A6 et la NADPH-réductase, 60 ou 30 µg de protéines de chaque échantillon, respectivement, sont séparés par électrophorèse sur un gel de sodium dodécyle sulfate/ polyacrylamide (7,5% polyacrylamide). Ces protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un système de transfert électrophorétique, opération qui prend une heure (Mini-trans-blot electrophoretic transfer system, Biorad, Hercules, CA, USA).

La NADPH-réductase est quantifiée à l'aide d'un anticorps monoclonal primaire anti-NADPH-réductase d'humain produit par la souris. La membrane de nitrocellulose est incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire à une dilution de 1:5000 dans du tampon de blocage (5% de lait en poudre dans du tampon de phosphate). Ensuite, la membrane est lavée et incubée avec de l'anti-GAPDH de lapin produit chez la souris à une dilution de 1:50 000 pendant une heure à la température de la pièce. L'anti-GAPDH est utilisé comme référence entre chaque expérience. Les protéines sont détectées grâce à un anticorps secondaire (IgG) anti-souris conjuguée à la peroxydase. La membrane de nitrocellulose est incubée pendant une heure avec l'anticorps à une dilution de 1:2000 dans du tampon de

blochage. La chimioluminescence est visualisée par autoradiographie (Kourylko et coll., 2005)

Le CYP3A6 est quantifié à l'aide d'un anticorps primaire monoclonal anti-CYP3A1 de rat produit par la souris qui recouvrait également le CYP3A6. La membrane de nitrocellulose est incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire à une dilution de 1 :250 dans du tampon de blocage. Comme pour le protocole utilisé pour déterminer l'expression de la NADPH-réductase, les membranes de nitrocelluloses sont incubées avec un anticorps anti-GAPDH pendant une heure. L'anticorps secondaire est le même que celui utilisé pour la NADPH-réductase. La chimioluminescence est visualisée par autoradiographie (Kourylko et coll., 2005).

L'intensité des bandes est mesurée par densitométrie avec le logiciel Un-Scan-It-Gel (Silk Scientific Inc., Orem, UT, USA).

5. Isolement de l'ARN messager dans des hépatocytes

L'isolement de l'ARN messager dans les hépatocytes est réalisé selon les directives du RNeasy Mini Kit de Quiagen. Une fois les hépatocytes déposés dans les plaques à six puits et incubés avec leurs produits respectifs, les cellules sont gardées pendant 48 heures à 37°C. Suite à l'incubation, les puits sont lavés avec 500 µL de PBS 1X et les hépatocytes mis en contact avec de la trypsine-EDTA 0,25% pendant environ une minute pour les décoller de la plaque. Afin de désactiver l'action de la trypsine, le surnageant est déposé dans du milieu de culture (WME) contenant du sérum; les

cellules sont ensuite centrifugées à 1200 g pendant 5 min, le surnageant est rejeté et le culot se garde à -80°C.

Chaque échantillon reste à -80°C jusqu'aux prochaines manipulations. Les hépatocytes sont lysés en les passant rapidement à travers une aiguille de 0,9 mm de diamètre. Par la suite, 350 µL d'éthanol sont rajoutés et le tout est déposé dans une colonne RNeasy et centrifugé 30 secondes à 130 000 rpm, le surnageant est décanté. Ensuite, 350 µL de solution RW1 sont ajoutés à la colonne qui est centrifugée pendant 30 secondes à 130 000 rpm, et par la suite, le surnageant est de nouveau décanté. Les échantillons sont incubés avec de la DNase diluée dans du tampon RDD pendant 15 minutes. La colonne est rincée avec du tampon RW1 et centrifugée pendant 30 secondes à 130 000 rpm, le surnageant est décanté. Cinq cent µL de tampon RPE sont ajoutés et centrifugés pendant 30 secondes à 130 000 rpm et le surnageant est décanté, cette étape est répétée deux fois. Afin d'éluer l'ARN messager, 20 ou 25 µL d'eau sont ajoutés à chaque échantillon et centrifugé dans un nouveau tube pour récupérer l'ARN messager. Les échantillons peuvent être conservés à -80°C. Tous les échantillons ont été analysés par QT-PCR en temps-réel par l'équipe de la plateforme Génomique, de l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie.

6. Mesure de la concentration de monoxyde d'azote

Dans une solution aqueuse, le monoxyde d'azote se dégrade rapidement. Les deux produits les plus stables de cette dégradation sont le nitrate et le nitrite. Ainsi, la

concentration de monoxyde d'azote dans le milieu de culture peut être évaluée en mesurant l'accumulation de ces deux produits. Le ratio nitrite/nitrate est très variable et dépend des voies de dégradation. Pour avoir une mesure précise de la concentration de monoxyde d'azote; il faut donc quantifier ces deux produits. Pour ce faire, il faut réduire le nitrate présent dans le milieu en nitrite, en utilisant la nitrate réductase; la quantité totale de nitrite se mesure en utilisant le réactif de Griess. Ce réactif est un composé de deux produits, la N-(1-naphthyl)éthylènediamine (N-NEDA) et la sulfanilamide.

Comme le montre la figure 17, la sulfanilamide va réagir avec le nitrite pour former le diazonium. Le diazonium va ensuite se lier au deuxième réactif, la N-NEDA pour former un colorant mesurable par spectrophotométrie à une absorbance de 540 nm.

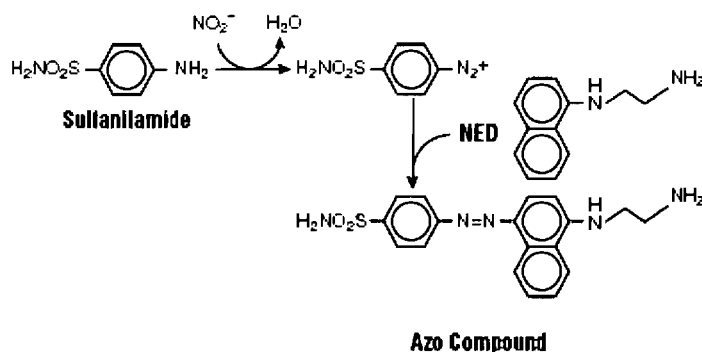


Figure 17. Réaction de Griess, formation d'un complexe azoïque.

Les surnageants du milieu de culture sont décongelés et centrifugés à 1000 x g pour enlever les restes de cellules et autres débris et des échantillons de 145 μL sont prélevés pour la réaction.

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

7. Analyses statistiques

Tous les résultats sont présentés sous forme de moyenne avec l'erreur standard (moyenne \pm erreur standard). La comparaison entre les divers groupes expérimentaux et leurs témoins est réalisée en effectuant une analyse de variance

suivie d'un test de « Student-Newman-Keuls » pour réaliser des comparaisons pairées des moyennes obtenues dans les différents groupes. Les différences sont considérées significatives lorsque le p est inférieur à 0,05. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SIGMA STAT.

8. Matériels

Le WME, la solution de Krebs, l'EGTA, le glucose, la collagène de type I, l'héparine, l'inhibiteur de trypsine, le gradient de percoll, le peroxyde d'hydrogène, le bisindolymaléimide, le 2-3 aminopurine, la genistéine, le SB203580, le LY294002, la wortmannine, le PD098059, le pyrrolidine dithiocarbamate, le DPI(diphénylèneiodonium), l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α , l'IFN- γ , le DCFH, l'HEPES, la glycine, le tampon TRIS, le MROD, la sulfanilamide et le N-NEDA 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 ont été achetés chez Fisher Scientific Canada (Ottawa, ON, Canada). Le sérum de veau et la pénicilline/streptomycine proviennent de chez Gibco (Invitrogen cell culture, Burlington, ON, Canada). La collagénase de type IV a été achetée chez Worthington Biochemicals (Lakewood, NJ, USA). La térébenthine provient de chez Recochem (Montréal, QC, Canada). Le DFB et le DFH ont été généreusement donnés par Merck Frost Canada (Kirkland, QC, Canada). 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-réductase ainsi que l'anticorps secondaire anti-souris

proviennent de Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). Le nitrate réductase et le lactate déshydrogénase ont été obtenus chez Roche Diagnostics (Mannheim, Allemagne).

C. Projet de recherche

Chez les lapins, la réaction inflammatoire diminue l'activité du CYP3A6 de 75% et diminue l'expression de 35% (Taherzadeh et coll., 2006). La baisse d'activité de 75% ne peut être que partiellement due à la perte d'expression de la protéine.

Notre hypothèse est que la diminution de l'activité du CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire est causée aussi par la diminution de l'activité de la NADPH-réductase.

L'objectif de ce projet était d'identifier les composantes de la réaction inflammatoire qui affecte l'activité de la NADPH-réductase et de confirmer le rôle de l'activité de la NADPH-réductase dans la diminution de l'activité du CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire.

1. La réaction inflammatoire et l'activité de la NADPH-réductase

Pour mieux comprendre et caractériser le lien entre le CYP3A6 et la NADPH-réductase lors de la réaction inflammatoire, nous allons mesurer l'activité et l'expression de la NADPH-réductase et du CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des hépatocytes venant de lapin ayant une réaction inflammatoire (H_{INFL}). La réaction inflammatoire chez les lapins est provoquée par l'injection sous-cutanée de térébenthine. Quarante huit heures plus tard, les animaux présentent une réaction inflammatoire aiguë caractérisée par une élévation de la température rectale et une augmentation des séromucoïdes (Kobusch et coll., 1986).

2. Les cytokines pro-inflammatoires et l'activité de la NADPH-réductase

Lors de la réaction inflammatoire, l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α et IFN- γ sont les principales cytokines effectrices. L'IL-1 β et L'IL6 sont les cytokines produisant la diminution de l'expression des CYP la plus puissante (Abdel-Razzak et coll., 1993). La diminution de l'activité et l'expression du CYP3A6 et de la NADPH-réductase dans les H_{INFL}, nous a permis d'émettre l'hypothèse suivante : les cytokines pro-inflammatoires causent une diminution de l'activité de la NADPH-réductase.

Des H_{CONT} seront incubés avec les médiateurs de la réaction inflammatoire aiguë, i.e. l'IL-6 (10 ng/mL), l'IL-1 (5 ng/mL), l'IFN- γ (10 ng/mL), le TNF- α (10 ng/mL). L'activité, l'expression et la quantité d'ARN messenger de la NADPH-réductase et du CYP3A6 seront mesurées.

3. L'IL-6 et l'IL-1 β et la production de monoxyde d'azote dans le milieu cellulaire.

Nous savons que les effets de la réaction inflammatoire sur l'activité et l'expression des CYP sont partiellement reproduits par l'IL-6 et l'IL-1 β (Morgan et coll., 1994). De plus, il a été démontré lors de la réaction inflammatoire que l'IL-1 β induit l'expression du monoxyde azote synthétase (isoforme inductible : iNOS) et engendre la libération de monoxyde d'azote (Geller et coll., 1993).

Notre hypothèse est que lors de la réaction inflammatoire, la production de monoxyde d'azote diminue l'activité de la NADPH-réductase et par conséquent, diminue l'activité du CYP3A6

Afin de s'assurer de l'augmentation de la production de monoxyde d'azote par les cytokines, nous allons incuber des H_{CONT} pendant 48 heures avec de l'IL-6 (10 ng/mL) et de l'IL-1 β (5 ng/mL). Suite à la période d'incubation, le surnageant cellulaire sera conservé à -80°C et la quantité de monoxyde sera mesurée par fluorométrie.

4. SNP, H₂O₂ et l'activité de la NADPH-réductase

La production de dérivés radicalaires de l'oxygène lors de la réaction inflammatoire contribue à la diminution de la quantité totale de CYP (Galal et du Souich, 1999). Le monoxyde d'azote et le peroxyde d'hydrogène diminuent la quantité de totale de CYP et la formation de métabolites de la théophylline de façon dose-dépendante (El-kadi et coll., 2000)

De plus, il a été démontré que l'inhibition de la synthèse du monoxyde d'azote empêche la diminution d'activité des CYP par les cytokines et que l'addition de générateurs de monoxyde d'azote diminue l'expression des CYP hépatiques (Carlson et Billings, 1996). Le monoxyde d'azote peut aussi interagir avec le fer ferrique et le fer ferreux de l'hème des CYP, inactivant de façon réversible ces

enzymes. Le monoxyde d'azote peut nitrotyrosiler les résidus tyrosines à proximité du site actif produisant une inactivation irréversible des CYP.

Le peroxyde d'hydrogène diminue l'ARN messager du CYP1A1 et CYP1A2 (Barker et coll., 1994). Le peroxyde d'hydrogène traverse les membranes des hépatocytes et devient une source de radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), le peroxyde d'hydrogène peut produire du dommage cellulaire ainsi que supprimer la transcription des CYP.

Notre hypothèse est que la diminution de l'activité des CYP par le monoxyde d'azote et le peroxyde d'hydrogène peut être secondaire à la diminution de l'activité de la NADPH-réductase.

Afin de vérifier cette hypothèse, les hépatocytes seront été incubés pendant 24 heures avec des concentrations croissantes de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (0.01, 0.05, 0.25, 0.5, 1, 1.5 et 2 mM) et des concentrations croissantes de nitroprussiate de sodium (SNP) (0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 et 1,5 mM). L'activité de la NADPH-réductase ainsi que l'activité du CYP3A6 seront mesurées.

5. Inhibiteurs de la voie du p38 MAPK et DFB

Il a déjà été démontré que la présence du SB203580 dans les hépatocytes augmente l'activité du CYP3A6 (Kourylko et coll., 2006). L'augmentation de l'activité de la protéine ne peut être expliquée par une augmentation de son expression. Nous

pensons que l'augmentation de l'activité est associée à un effet sur le cycle catalytique des CYP, plus particulièrement sur la NADPH-réductase. Notre hypothèse est que l'augmentation de l'activité du CYP3A6 par le SB203580 serait due, en partie, par l'augmentation de l'activité de la NADPH-réductase.

Pour vérifier s'il existe un effet de coopérativité entre la sonde utilisée pour l'activité du CYP3A6 et le SB203580, nous allons incuber des H_{CONT} avec des concentrations croissantes de SB203580 (0, 5, 10, 25, 50 et 100 µM) pendant 24 heures. L'activité du CYP3A6 sera mesurée en utilisant des concentrations croissantes de DFB (0, 15, 45 et 90 µM).

Nous allons aussi vérifier la non-coopérativité entre le DFB et le SKF96002 en incubant des concentrations croissantes de SKF96002 (0, 10, 25 et 50 µM) avec des hépatocytes procédant d'un lapin témoin pendant 24 heures en présence ou non de DFB.

6. Diphénylèneiodonium (DPI), inhibiteurs de la voie du p38 MAPK et activité de la NADPH-réductase

Afin d'étudier la contribution de la NADPH-réductase à l'augmentation de l'activité du CYP3A6 par le SB203580, nous allons utiliser un inhibiteur de la NADPH-réductase, le DPI (10 µM). L'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6 seront mesurées dans des hépatocytes incubés pendant 24 heures avec ces inhibiteurs.

Afin d'étudier l'effet de la NADPH-réductase seul, nous allons utiliser un inhibiteur du cytochrome *b*₅, le p-hydroxymercuribenzoate (pHMB 200 µM), seul ou en combinaison avec le DPI. Dans cette expérience, le pHMB et le DPI seront ajoutés au milieu de cultures contenant les hépatocytes, 2 heures avant la fin de l'incubation. L'activité de la NADPH-réductase, du cytochrome *b*₅ et du CYP3A6 seront mesurées dans des hépatocytes incubés pendant 24 heures avec ces inhibiteurs.

Nous allons ensuite étudier l'effet du SKF96002 (25 µM), inhibiteur du p38 MAPK, sur l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6. Comme pour l'étude précédente, nous allons utiliser les inhibiteurs de la NADPH-réductase et du cytochrome *b*₅, soit le DPI et le pHMB respectivement, afin d'évaluer la contribution de la NADPH-réductase à la réduction de l'activité du CYP3A6. Le SKF96002 sera incubé pendant 24 heures, le DPI et le pHMB seront ajoutés 2 heures avant la fin de la période d'incubation. L'activité du CYP3A6 et de la NADPH-réductase seront mesurées.

7. IL-6, inhibition de la p38 MAPK et l'activité de la NADPH-réductase

Les résultats présentés par Kourylko et coll., nous indiquent qu'un inhibiteur de la voie du p38 MAPK, le SB203580, prévient l'inactivation du CYP3A6 induite par l'IL-6 (Kourylko et coll., 2006). Afin d'étudier l'impact de la voie du p38MAPK lors de la réaction inflammatoire, nous allons étudier l'effet de la combinaison du SB203580 et du SKF86002 avec l'IL-6 sur l'activité de la NADPH-réductase.

Des H_{CONT} seront incubés pendant 24 heures en présence d'IL-6 (10 ng/mL) avec et sans SB203580 (25 µM) ou SKF86002 (25 µM). L'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6 seront mesurées.

8. Inhibition des protéines kinases et activité de la NADPH-réductase en présence d'IL-6

Afin d'étudier les voies de signalisation impliquée dans la régulation de la NADPH-réductase, nous avons utilisés les inhibiteurs de la PI₃K, des ERK et des STAT en présence et en absence d'IL-6 (10 ng/mL).

Les inhibiteurs utilisés seront les LY294002 et Wortmannine des inhibiteurs de la PI₃K; le PD098059 un inhibiteur des ERK; le pyrrolidine dithiocarbamate un antioxydant (Sherman et coll., 1993) et inhibiteur de l'activation du Nf-κB; le picéatannol un inhibiteur des STAT3, plus précisément, de la JAK1 kinase. Vingt-quatre heures après l'ajout des inhibiteurs, nous mesurerons l'activité de la NADPH-réductase.

9. Inhibiteurs de protéines phosphatases et activité de la NADPH-réductase

Puisque l'IL-6 est impliqué dans la réaction inflammatoire et que les protéines phosphatases 1 et 2A modulent la production de protéines de la phase aiguë par l'IL-6 (Ganapathi, 1992), nous allons étudier l'effet des inhibiteurs de protéines

phosphatase sur l'activité, l'expression et l'ARN messenger de la NADPH-réductase et du CYP3A6.

Des H_{CONT} seront incubés pendant 24 heures et 48 heures avec l'acide okadaïque (50 nM) et la calyculine A (50 nM). L'activité, l'expression et la quantité d'ARN messenger de la NADPH-réductase et du CYP3A6 seront mesurées.

10. Inhibiteurs des protéines kinases en combinaisons avec la calyculine A et activité de la NADPH-réductase

Afin de déterminer le rôle de la calyculine A dans la modulation de l'activité de la NADPH-réductase, nous allons utiliser les principaux inhibiteurs de voies de signalisation (bisindolymaléimide IV, LY294002, PD098059, pyrrolidine dithiocarbamate, SB203580) et inhiber les protéines phosphatases par l'ajout de calyculine A. Nous mesurons l'activité, l'expression et l'ARN messenger de la NADPH-réductase et du CYP3A6 dans des H_{CONT}.

Trente minutes après l'ajout des inhibiteurs des voies de signalisation, l'inhibiteur de protéines phosphatase sera ajouté au milieu de culture. Les inhibiteurs seront incubés avec les hépatocytes pendant 48 heures. La calyculine A servira à inhiber l'action des protéines phosphatases (PP1 et PP2A) dans la cellule.

D. Résultats

1. Effet de la réaction inflammatoire sur le CYP3A6 et la NADPH-réductase

a. NADPH-réductase

Afin d'évaluer la possible implication de la NADPH-réductase dans la diminution de l'activité du CYP3A6 par la réaction inflammatoire, nous avons étudié l'effet de la réaction inflammatoire sur l'activité de la NADPH-réductase, sur son expression et sur la quantité d'ARN messenger de la *NADPH-réductase*.

Pour étudier l'effet de la réaction inflammatoire sur l'activité de la NADPH-réductase dans le temps, nous avons tout d'abord mesuré l'activité et la quantité d'ARN messenger de la NADPH-réductase dans les hépatocytes provenant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans les hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire (H_{INFL}), après leur incubation dans du milieu de culture pendant 24 heures. Le panneau A de la figure 18 nous permet de constater que l'activité de la NADPH-réductase des H_{INFL} est 34% ($p < 0,05$) plus petite que l'activité mesurée dans les H_{CONT} . Le panneau B de la figure 18 montre que la quantité d'ARN messenger de la *NADPH-réductase* est légèrement plus élevée dans les H_{INFL} que dans le H_{CONT} , différence non significative.

La figure 19 illustre les changements d'activité, d'expression et d'ARN messenger de la NADPH-réductase dans des hépatocytes incubés pendant 48 heures. Par rapport aux H_{CONT} , l'activité de la NADPH-réductase dans les H_{INFL} est diminuée de 22% (p

<0,05), l'expression de la protéine de la NADPH-réductase est diminuée de 21 % ($p < 0,05$) et la quantité d'ARN messager de la *NADPH-réductase* est diminuée de 38% ($p < 0,05$).

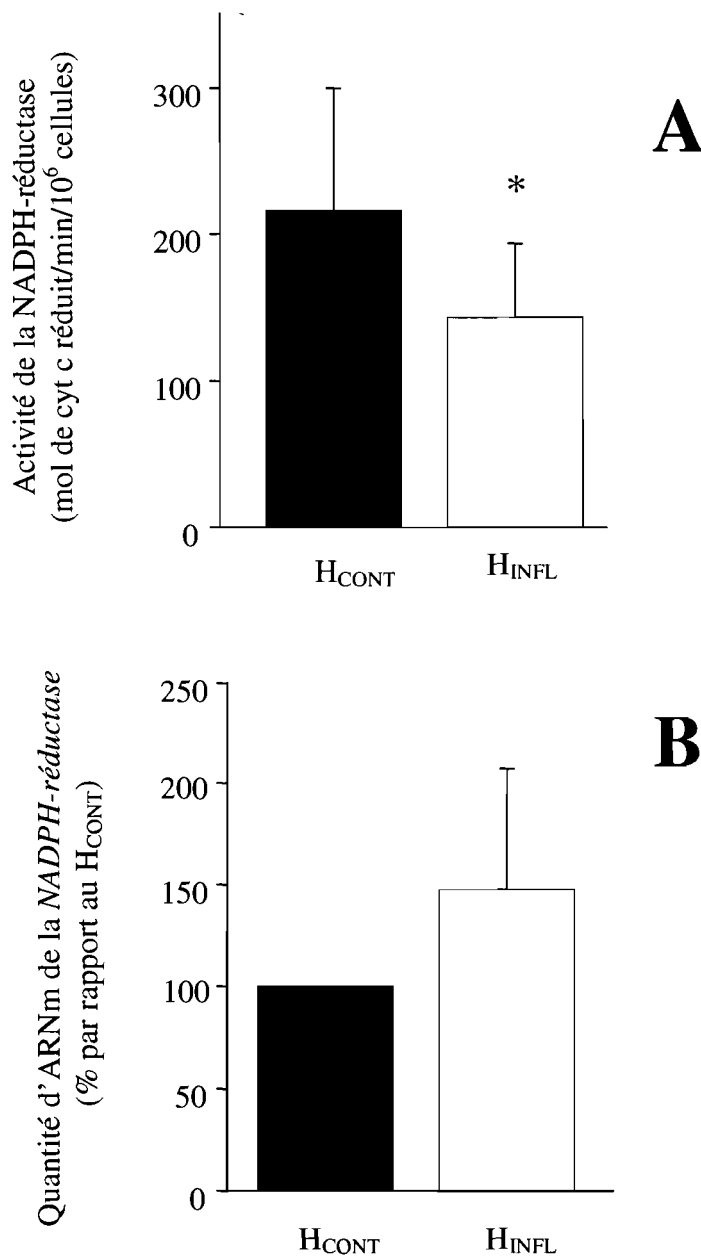


Figure 18. (A) Activité et (B) quantité d'ARN messager de la NADPH-réductase mesurée dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire (H_{INFL}), après 24 heures d'incubation. A : n=8, B : n=7. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être détectée. * $p < 0,05$ comparé à H_{CONT}

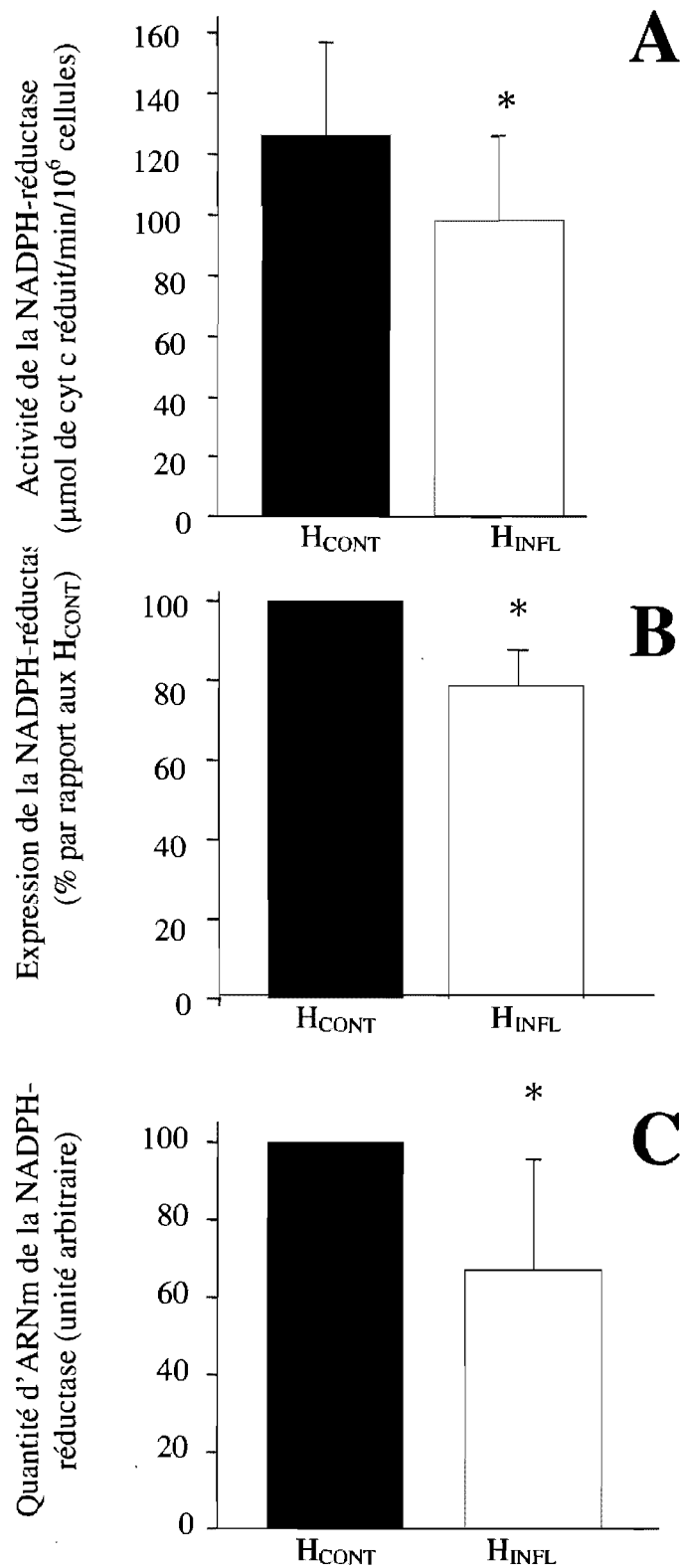


Figure 19. (A) Activité, (B) expression protéique (105592 ± 13285) et (C) quantité d'ARN messager de la *NADPH-réductase* déterminées dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire (H_{INFL}) suite à 48 heures d'incubation. A : n=8, B : n=7, C : n=7. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est, notre contrôle, aucune variation ne peut être détectée *p < 0,05 comparé à H_{CONT}

b. CYP3A6

Afin d'étudier l'effet de l'activité de la NADPH-réductase sur l'activité du CYP3A6, nous avons comparé l'activité, l'expression et l'ARN messenger du CYP3A6 dans des H_{CONT} à celles mesurées dans des H_{INFL}.

Les hépatocytes ont été incubés pendant 24 heures. L'activité du CYP3A6 des H_{INFL} est diminuée de 65% ($p < 0,05$) (panneau A, figure 20) par rapport à l'activité du CYP3A6 mesurée dans des H_{CONT}. Dans les H_{INFL} la quantité d'ARN messenger ne subit aucun changement significatif lorsqu'ils sont incubés pendant 24 heures.

Pour étudier l'effet du temps sur l'activité du CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire, nous avons mesuré l'activité, l'expression et l'ARN messenger du CYP3A6 dans des H_{CONT} et des H_{INFL} incubés pendant 48 heures. Comme illustré dans le panneau A de la figure 21, par rapport aux H_{CONT}, l'activité du CYP3A6 est diminuée de 60% ($p < 0,05$) dans les H_{INFL} et l'expression du CYP3A6 est diminuée de 39% ($p < 0,05$) par comparaison aux H_{CONT} (Figure 23, B). De plus, la quantité d'ARN messenger du CYP3A6 dans les H_{INFL} est diminuée de 38% ($p < 0,05$) par rapport à l'ARN messenger du CYP3A6 dans les H_{CONT} (Figure 21, C).

Ces expériences nous confirment que la réaction inflammatoire aseptique diminue l'expression et l'activité de la NADPH-réductase parallèlement à la diminution de l'expression et l'activité du CYP3A6.

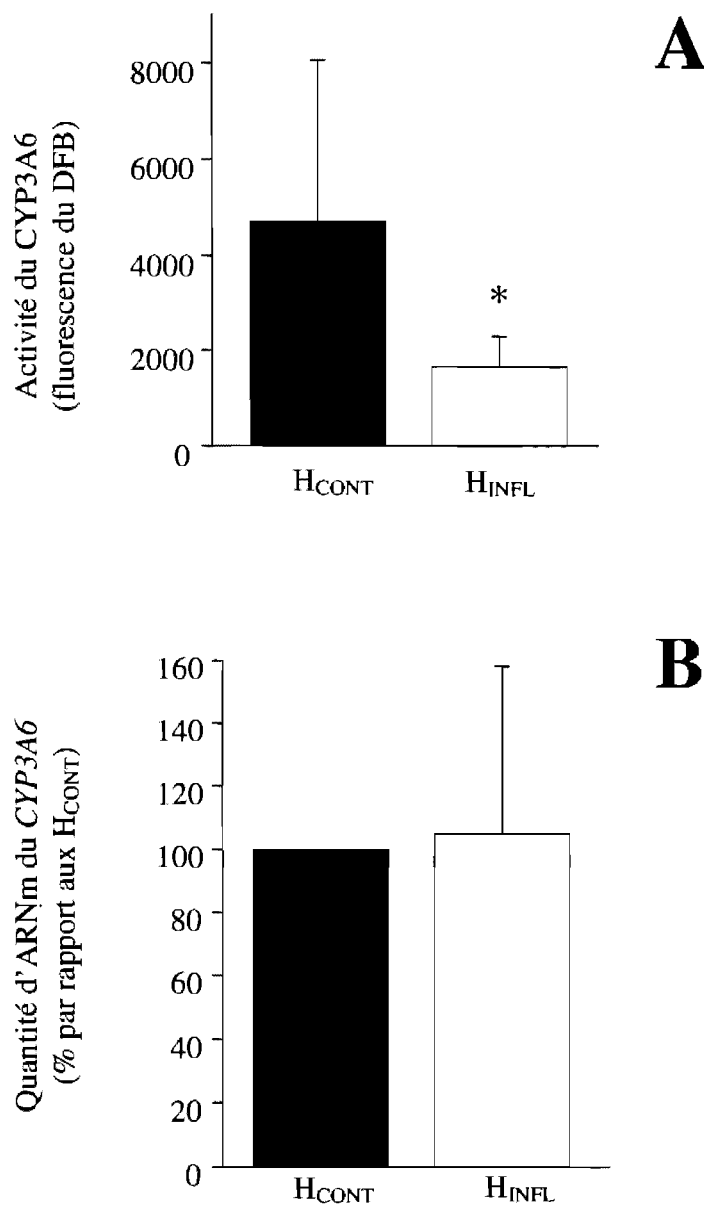


Figure 20. (A) Activité et (B) quantité d'ARN messenger du *CYP3A6* mesurée dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire (H_{INFL}), après 24 heures d'incubation. A : n=8, B : n=8. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. *p < 0,05 comparé à H_{CONT}

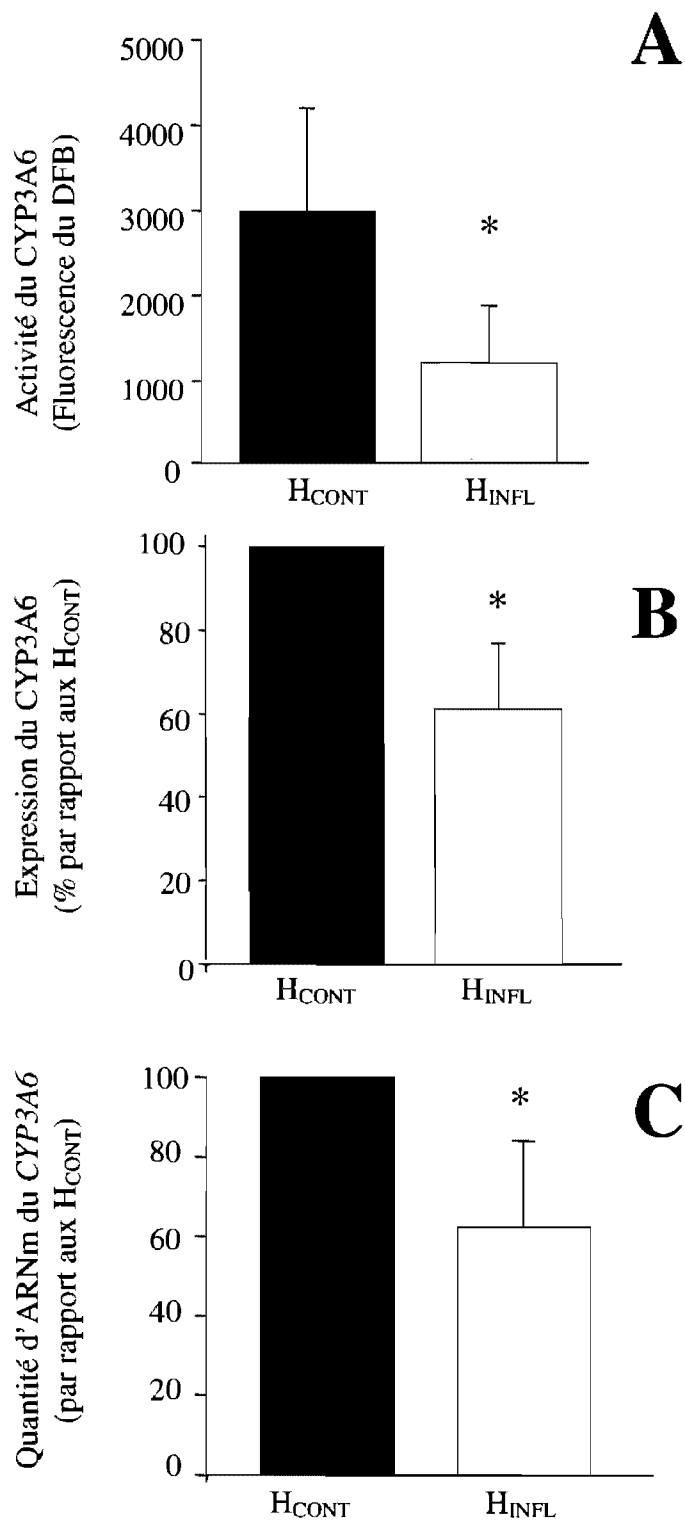


Figure 21. (A) Activité, (B) expression protéique (H_{CONT} : 25485 ± 10234) et (C) quantité d'ARN messenger du *CYP3A6* déterminées dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des hépatocytes procédant de lapins avec une réaction inflammatoire (H_{INFL}), suite à 48 heures d'incubation. A : n=9, B : n=8, C : n=6. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. *p < 0,05 comparé à H_{CONT}

2. Modulation de la NADPH-réductase par les cytokines pro-inflammatoires

La réaction inflammatoire active de nombreuses cytokines dont, l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α et IFN- γ qui sont responsable de la diminution de l'expression des enzymes du cytochrome P450. Pour déterminer l'effet de ces cytokines sur l'activité, l'expression et la quantité d'ARN messenger de la NADPH-réductase et du CYP3A6, ces cytokines ont été incubées pendant 48 heures avec des hépatocytes.

a. NADPH-réductase

Nous avons mesuré l'effet des cytokines pro-inflammatoires, incubées pendant 48 heures avec des H_{CONT}, sur l'activité, l'expression et la quantité d'ARN messenger de la NADPH-réductase.

Lorsque l'on compare l'activité de la NADPH-réductase dans des H_{CONT} à l'activité dans des H_{CONT} incubés avec l'IL-6, on note une diminution de l'activité de 6% ($p < 0,05$). L'expression de la NADPH-réductase diminue de 50% ($p < 0,05$) et la quantité d'ARN messenger ne subit aucun changement significatif en présence d'IL-6 (figure 22, panneau A).

L'effet de l'IL-1 β sur l'activité, l'expression et la quantité d'ARN messenger de la NADPH-réductase sont illustrés dans le panneau B de la figure 22. L'activité de la NADPH-réductase des H_{CONT} incubés avec de l'IL-1 β est diminuée de 14% ($p < 0,05$) par rapport à l'activité de la NADPH-réductase, dans des H_{CONT}. L'IL-1 β

diminue l'expression de la NADPH-réductase de 19% ($p < 0,05$), et la quantité de son ARN messager est diminuée de 20% ($p < 0,05$) par rapport à la quantité retrouvée dans les H_{CONT}.

L'ajout d'INF- γ au milieu de culture contenant des hépatocytes ne modifie pas l'activité de la NADPH-réductase. L'INF- γ ne produit aucun changement significatif de l'expression et de la quantité d'ARN messager de la *NADPH-réductase* dans des H_{CONT} (panneau A, figure 23). De façon semblable, la présence de TNF- α ne change pas l'activité, l'expression et l'ARN messager de la NADPH-réductase dans les H_{CONT} (figure 23, panneau B).

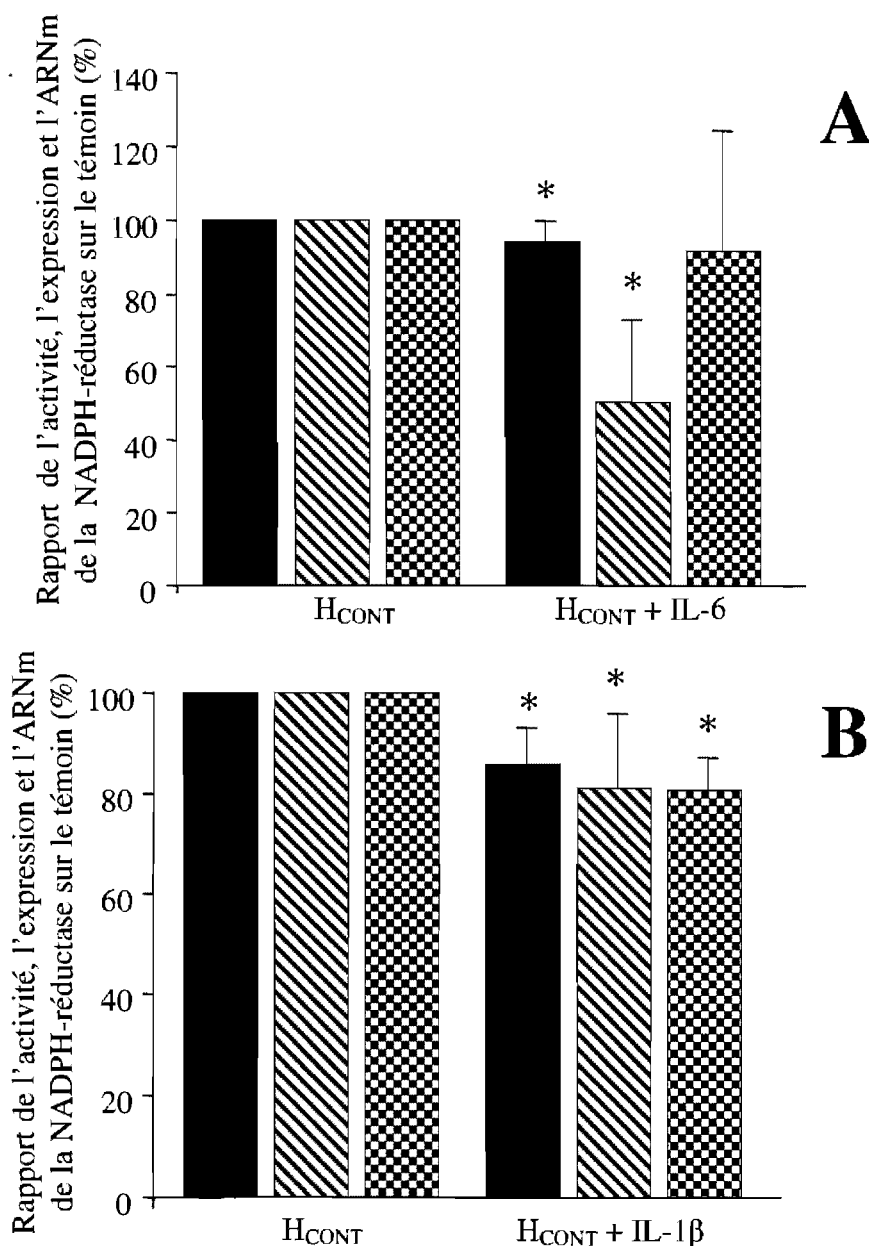


Figure 22. (A) Activité (103 ± 13) ■ $n=5$, expression protéique (100048 ± 25354) ▨ $n=4$ et ARN messenger ▩ $n=3$, de la NADPH-réductase dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec du IL-6 (B) Activité (140 ± 10) ■ $n=5$, expression (79585 ± 18142) ▨ $n=5$ et ARN messenger ▩ $n=4$, de la NADPH-réductase dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec de l'IL-1β. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. * $p < 0,05$ comparé à H_{CONT}

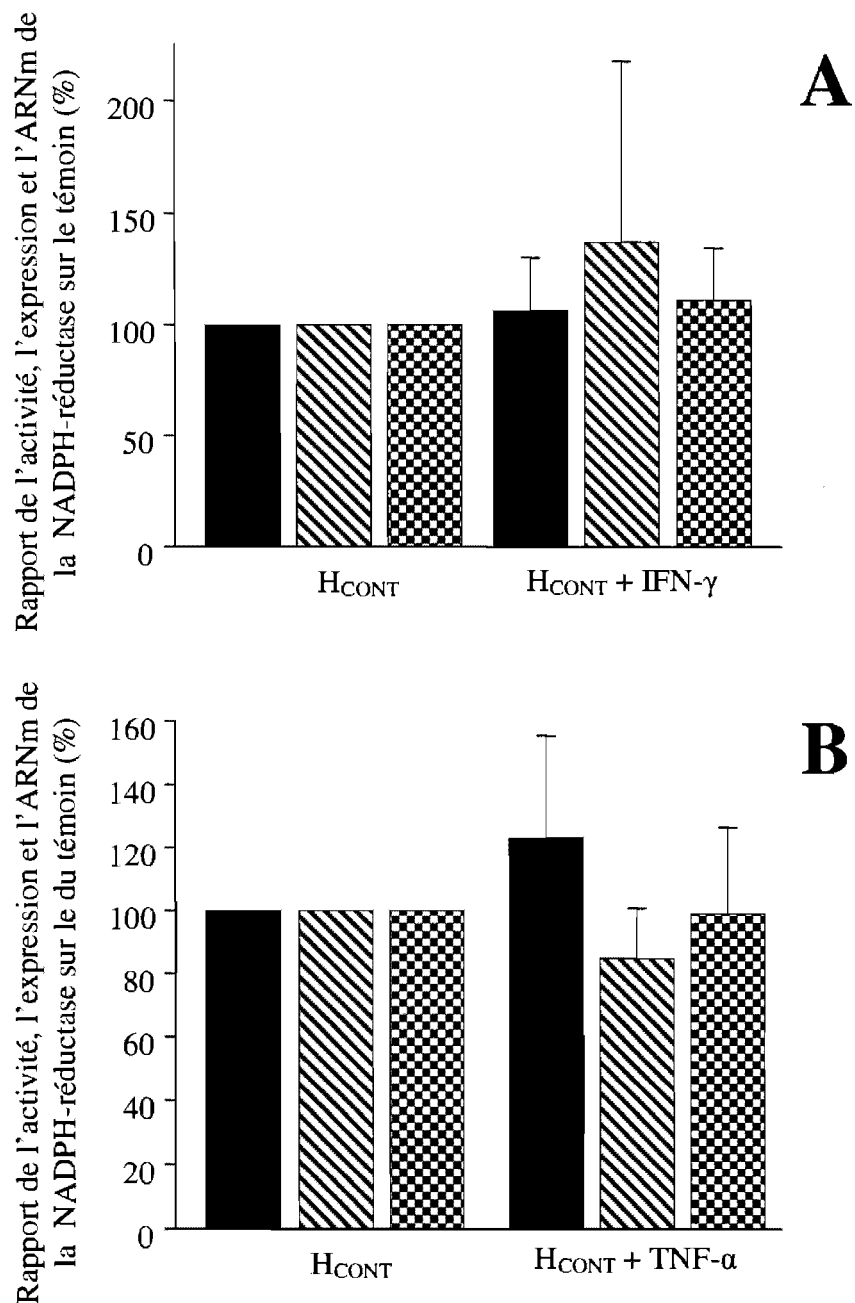


Figure 23. (A) Activité (122 ± 8) ■ n= 18, expression protéique (104899 ± 17373) ▨ n= 6 et ARN messenger ▩ n= 7, de la NADPH-réductase dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec de l'IFN- γ (B) Activité (132 ± 13) ■ n=9, expression (65516 ± 19882) ▨ n=3 et ARN messenger ▩ n=9, de la NADPH-réductase dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec du TNF- α . L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée

b. CYP3A6

L'effet de l'IL-6 sur l'activité, l'expression et la quantité d'ARN messager du CYP3A6, dans des H_{CONT} incubés pendant 48 heures, est présenté dans la figure 24 (panneau A). Lorsque l'on compare l'activité du CYP3A6 des H_{CONT} à l'activité du CYP3A6 des H_{CONT} incubé avec de l'IL-6, on remarque une diminution de 16% ($p < 0,05$). L'expression du CYP3A6 diminue de 53% ($p < 0,05$) et la quantité d'ARN messager est diminuée de 66% ($p < 0,05$) par la présence d'IL-6.

Par rapport à l'activité du CYP3A6 dans les H_{CONT}, l'incubation des hépatocytes avec de l'IL-1 β pendant 48 heures a diminué l'activité du CYP3A6 de 13% ($p < 0,05$). L'expression du CYP3A6 diminue de 30% ($p < 0,05$), mais la quantité d'ARN messager demeure inchangée en présence d'IL-1 β (figure 24, panneau B).

La présence d'IFN- γ ne produit pas d'effet significatif sur l'activité, l'expression et l'ARN messager du CYP3A6 dans des H_{CONT} (Figure 25, panneau A). De même, la présence de TNF- α dans le milieu cellulaire ne produit aucun changement significatif de l'activité, de l'expression et de la quantité d'ARN messager du CYP3A6 lorsque le TNF- α est incubé avec les H_{CONT} pendant 48 heures (Figure 25, panneau B).

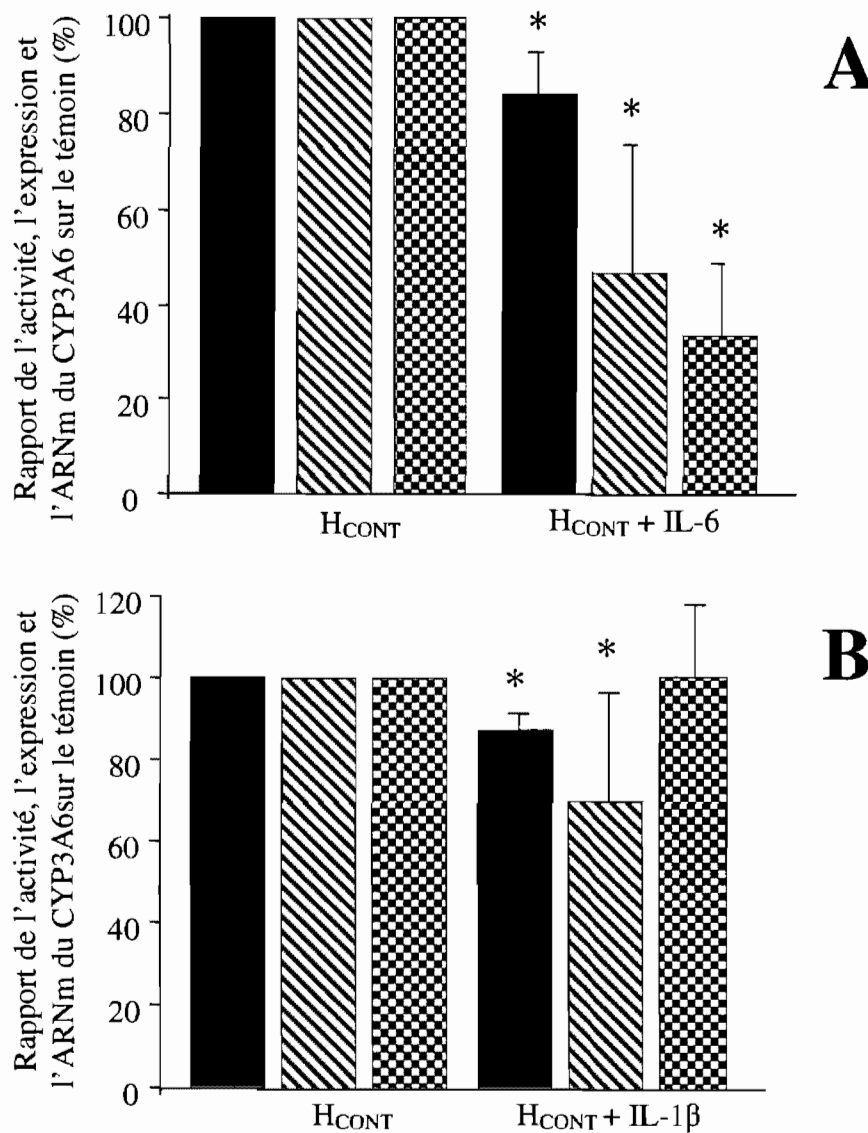


Figure 24. (A) Activité (3257 ± 471) ■ n=5, expression protéique (119196 ± 43741) ▨ n=5 et ARN messenger ▩ n=4, du CYP 3A6 dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec l'IL-6 (B) Activité (3003 ± 402) ■ n=5, expression (364102 ± 317160) ▨ n=4 et ARN messenger ▩ n=3, du CYP 3A6 dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec l'IL-1 β . L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée *p < 0,05 comparé à H_{CONT}

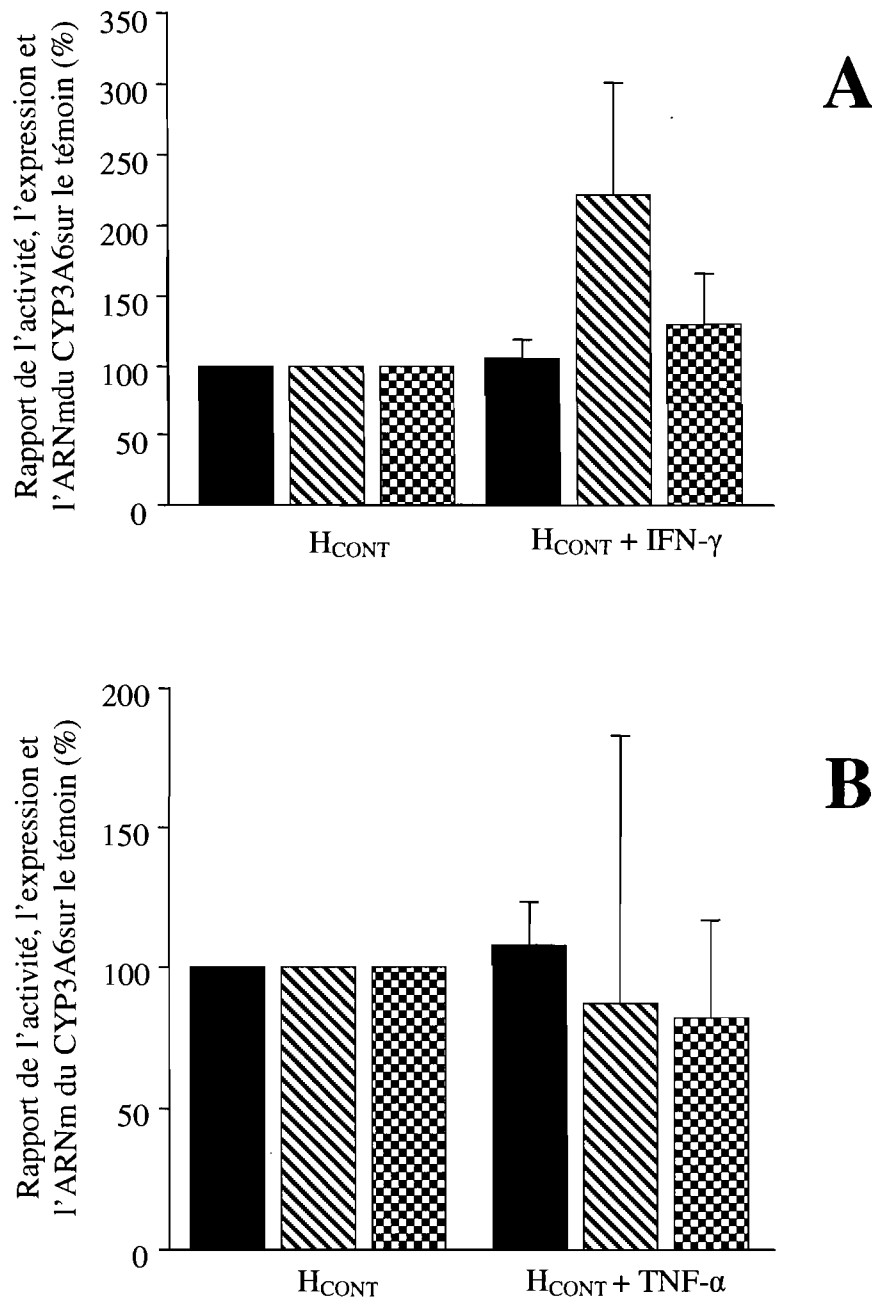


Figure 25. (A) Activité (3220 ± 303) ■ n= 18, expression protéique (70296 ± 35035) ▨ n= 5 et ARN messenger ▩ n= 8, du CYP 3A6 dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec l'IFN- γ (B) Activité (3419 ± 557) ■ n=9, expression (47872 ± 34334) ▨ n=3 et ARN messenger ▩ n=4, du CYP 3A6 dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) et dans des H_{CONT} incubés pendant 48h avec du TNF- α . L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée.

3. Effet de l'IL-6 et de l'IL-1 β sur la quantité de NO \cdot dans le milieu cellulaire.

Le monoxyde d'azote peut diminuer l'activité des isoformes du cytochrome P450. En conséquence, il était intéressant de documenter l'effet des cytokines sur la production de monoxyde d'azote dans le milieu cellulaire. Pour ce faire, nous avons mesuré la quantité de nitrites dans le surnageant des H_{CONT} incubés pendant 48 heures avec de l'IL-6 et de l'IL-1 β .

Lorsque nous comparons la quantité de nitrites dans le surnageant des H_{CONT} à celle mesurée dans les H_{CONT} incubés avec de l'IL-6, nous constatons que le monoxyde d'azote est augmenté de 52% ($p < 0,05$), tandis que l'ajout d'IL-1 β aux H_{CONT} ne modifie pas significativement la concentration de monoxyde d'azote (figure 26).

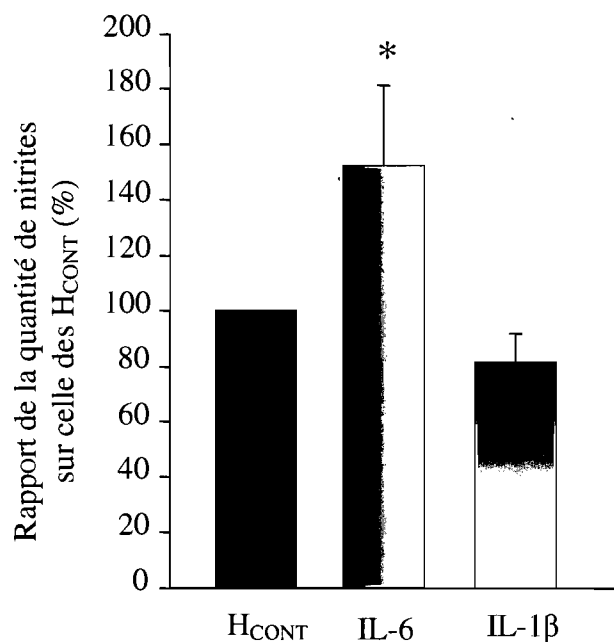


Figure 26. Concentration de nitrites dans le surnageant des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) ($1,9 \pm 0,6$) ■, en présence d'IL-6 □ ou en présence d'IL-1 β ▣ * $p < 0,05$ comparé à H_{CONT} (n=3)

4. Effet du SNP et du H₂O₂ sur l'activité du CYP3A6 et de la NADPH-réductase

Le monoxyde d'azote et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sont des médiateurs importants impliqués dans la réaction inflammatoire. Nous avons étudié l'effet sur l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6 de l'ajout de SNP (nitroprussiate de sodium, donneur de monoxyde d'azote) et de H₂O₂ au milieu cellulaire contenant des H_{CONT}. Les hépatocytes ont été incubés pendant 24 heures et l'activité du CYP3A6 et de la NADPH-réductase ont été ensuite mesurées.

a. Nitroprussiate de sodium (SNP)

Le panneau A de la figure 27 représente la diminution dose-dépendante de l'activité du CYP3A6 par le SNP. L'effet maximal prédit (E_{MAX}) du SNP devrait entraîner une diminution de l'activité du CYP3A6 de 1419 de fluorescence et la concentration de SNP qui diminue de 50% l'activité maximale (EC₅₀) est de 0,034 mM. Similairement, le SNP diminue l'activité de la NADPH-réductase de façon dose-dépendante, avec un E_{MAX} prédit de 257 µmol de cytochrome c réduit/min/10⁶ cellules et un EC₅₀ de 0,027 mM (panneau B).

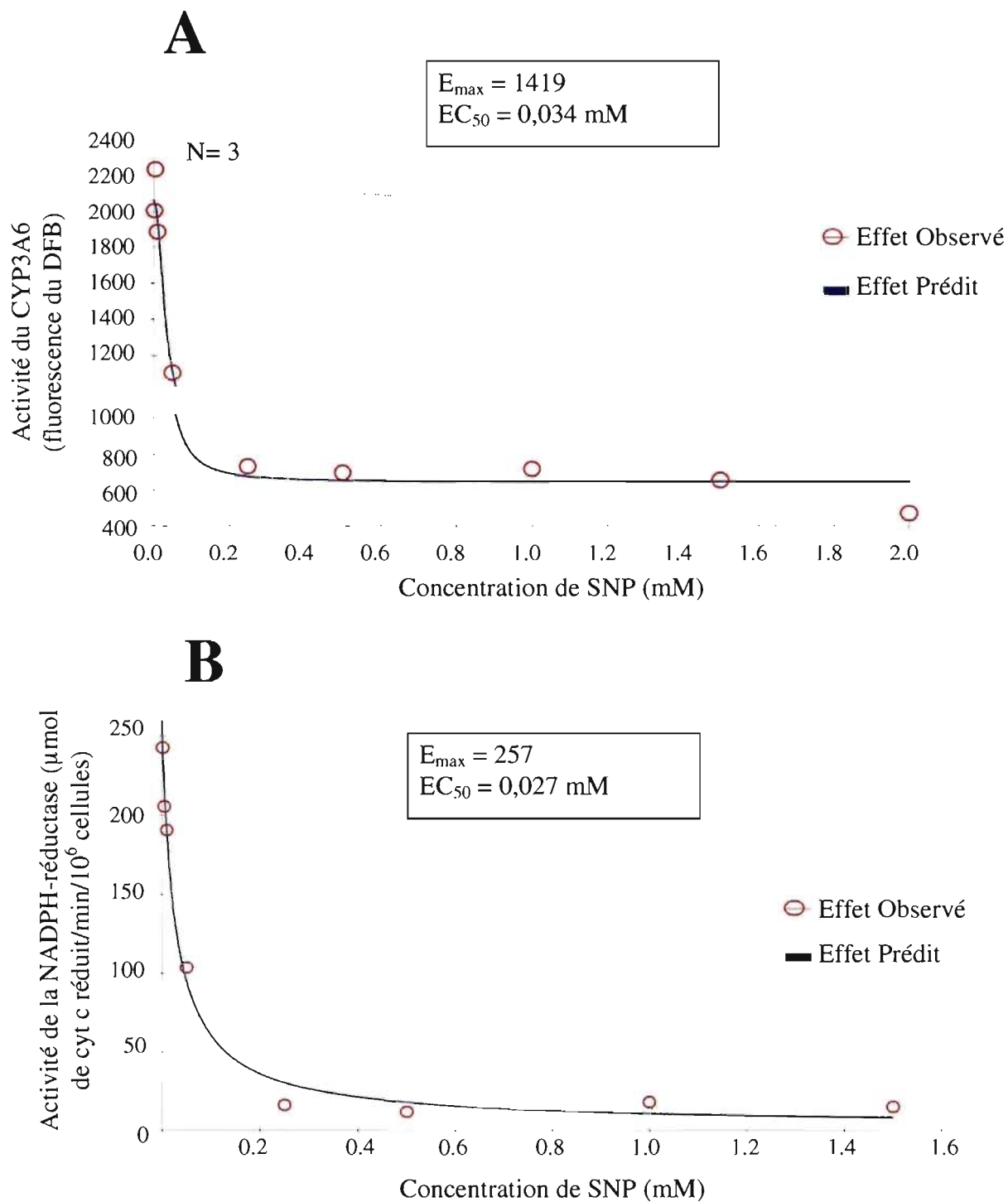


Figure 27. (A) Activité du CYP3A6 et (B) l'activité de la NADPH-réductase dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) en présence de concentrations croissantes de SNP ($n=3$).

b. H₂O₂

Le H₂O₂ diminue l'activité du CYP3A6 de façon dose-dépendante avec un E_{max} de 95% et un EC₅₀ de 1,86 mM (figure 28, panneau A). Le H₂O₂ diminue aussi l'activité de la NADPH-réductase; l'effet maximum prédit serait de 80 μmol de cytochrome c réduit/min/10⁶ cellules et la puissance du H₂O₂ pour diminuer de 50% l'activité maximale de la NADPH-réductase est à 0,31 mM (figure 28, panneau B).

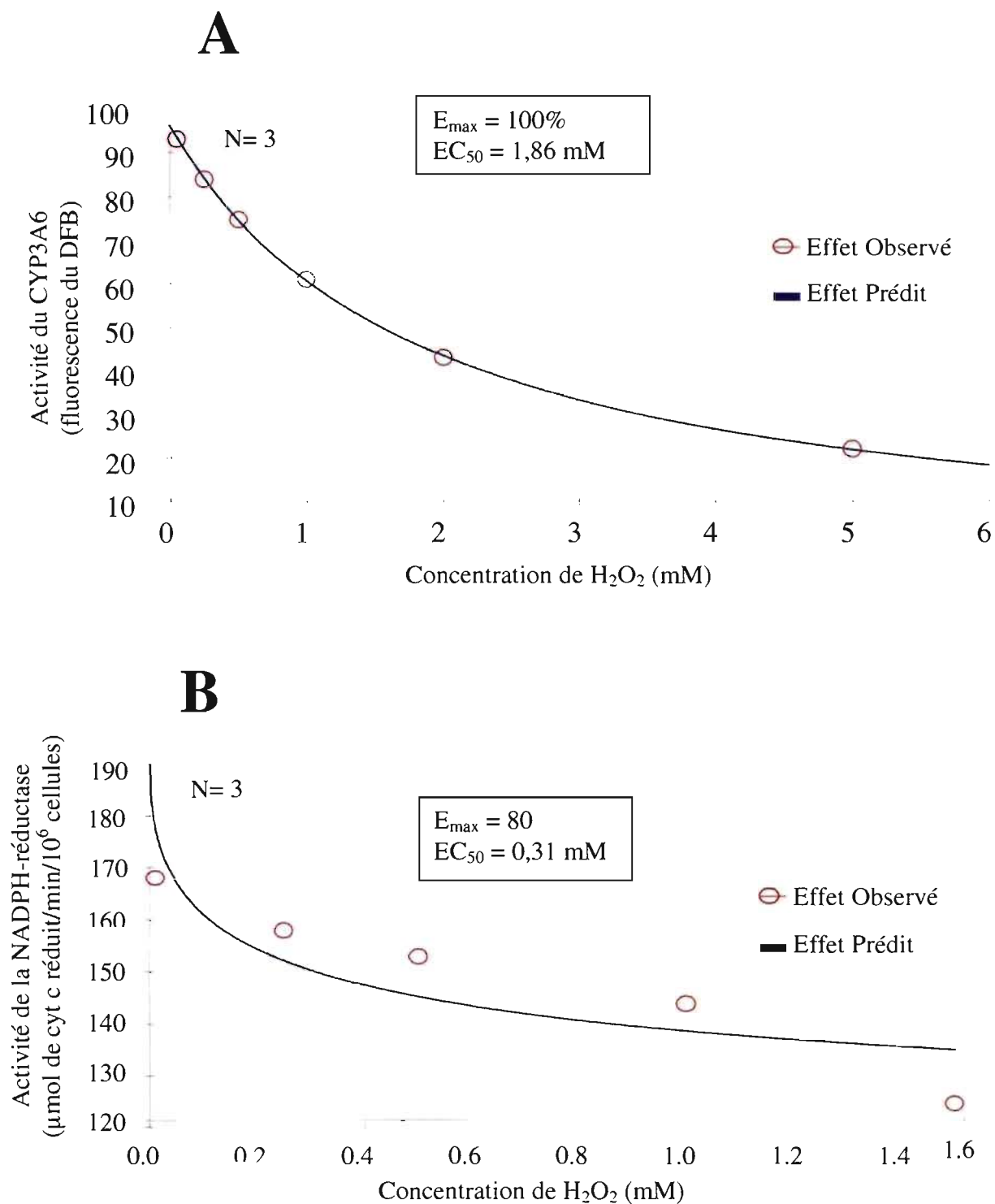


Figure 28. (A) Activité du CYP 3A6 et (B) activité de la NADPH-réductase dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) en présence de concentrations croissantes de H_2O_2 ($n=3$).

5. Effet du SB203580 et du SKF86002 combinés avec le DFB sur l'activité de la NADPH-réductase

Des études précédentes suggèrent que l'inhibition de la p38 MAPK avec le SB203580 augmentait l'activité du CYP3A6. Cependant, nous n'avons pas exclu que cette augmentation d'activité soit secondaire à un artéfact relié au SB203580. Des études ont donc été réalisées pour déterminer si c'est l'inhibition de la p38 MAPK ou le SB203580 qui augmente l'activité du CYP3A6.

Afin de déterminer la fluorescence de base émise par le SB203580 nous avons incubé des concentrations croissantes de SB203580 avec des H_{CONT} pendant 24 heures en absence de DFB (sonde pour déterminer l'activité du CYP3A6) et en présence de concentration croissantes de DFB. Nous avons réalisé les mêmes expériences en présence d'un autre inhibiteur de la voie du p38 MAPK, le SKF86002 (figure 30 et 31 respectivement).

Lorsque le SB203580 est incubé pendant 24 heures dans du tampon Krebs, la fluorescence augmente avec des concentrations croissantes de SB203580 (figure 29). De plus, en incubant le SB203580 pendant 24 heures avec des H_{CONT} en absence de sonde utilisée pour déterminer l'activité du CYP3A6, le DFB, la fluorescence augmente de façon dose-dépendante (figure 30). La concentration de 25 μ M de SB203580, utilisée pour inhiber la p38 MAPK, émet une fluorescence d'environ 12500; l'ajout de DFB augmente cette fluorescence. Par contre, lorsque les H_{CONT} sont incubés avec des concentrations croissantes de SKF86002 la fluorescence émise

oscille autour de 250, ce qui correspond au bruit de fond (figure 31); c'est-à-dire que l'inhibition de la p38 MAPK par le SKF86002 n'augmente pas la fluorescence de base. Par ailleurs, lorsque les H_{CONT} sont incubés avec des concentrations croissantes de SKF86002 et 60 μ M de DFB (concentration utilisé pour déterminer l'activité du CYP3A6), la fluorescence émise par le DFB n'est pas affecté par le SKF86002.

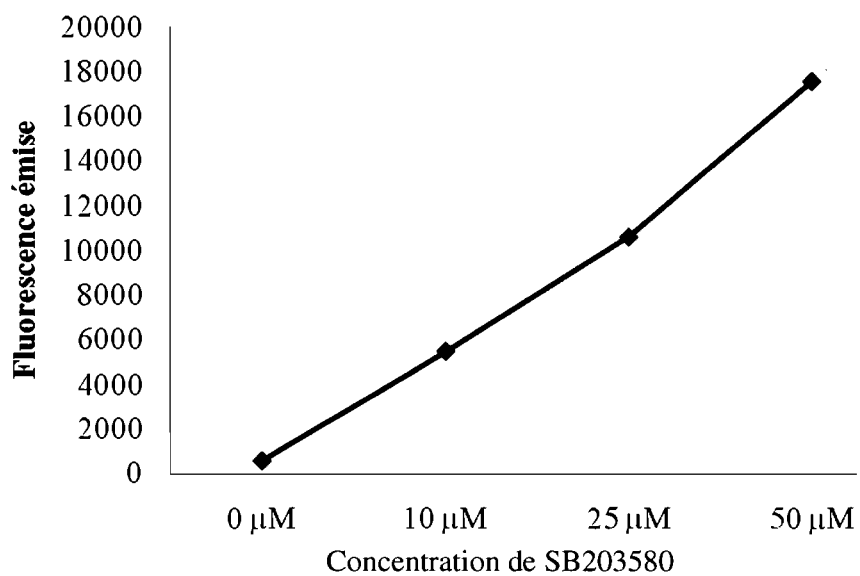


Figure 29. Fluorescence émise en fonction des concentrations croissantes de SB203580 incubé pendant 24 heures dans du tampon Krebs, sans hépatocytes (n=1)

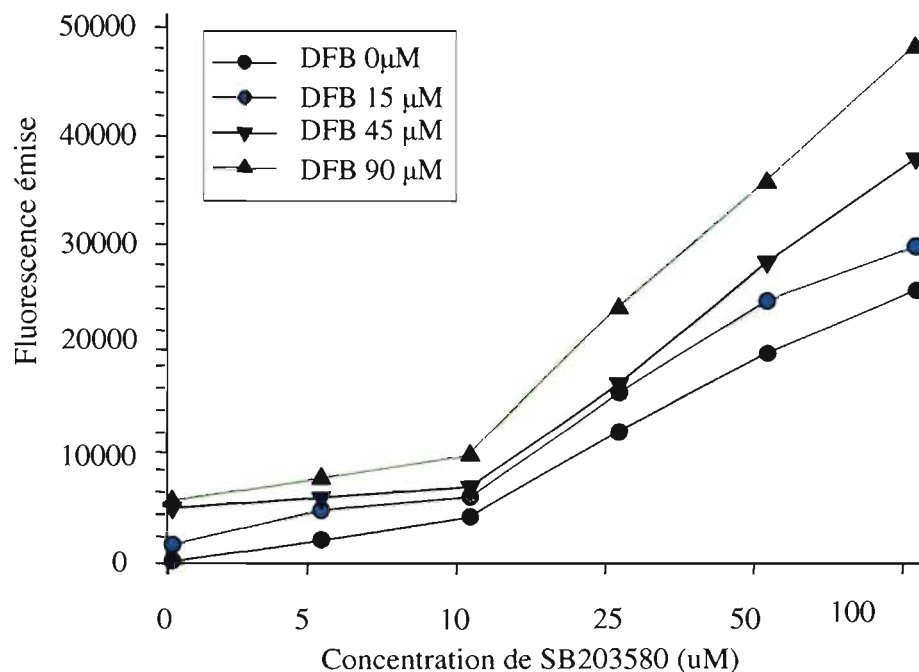


Figure 30. Activité du CYP3A6 dans des hépatocytes procédant de lapin témoin en présence ou en absence de concentrations croissantes de SB203580 et de DFB (n=1).

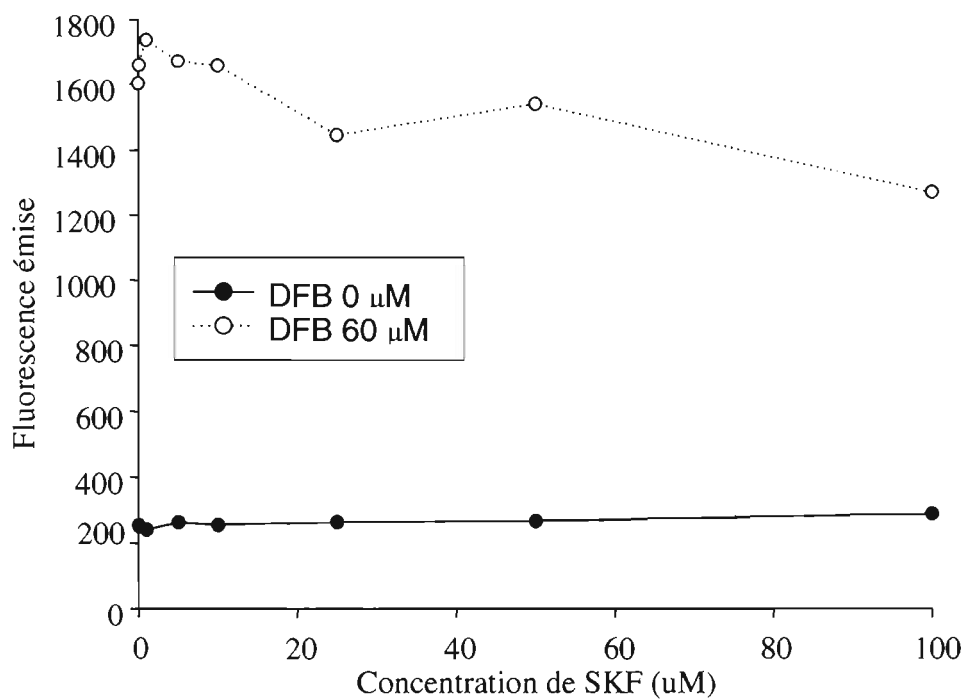


Figure 31. Activité du CYP3A6 dans des hépatocytes procédant de lapin témoin en présence de concentrations croissantes de SKF86002, avec et sans DFB (n=1).

6. Étude de l'activité de la NADPH-réductase en présence de diphénylèneiodonium (DPI) et des inhibiteurs de la p38 MAPK

Les études décrites précédemment suggèrent que la présence de SB203580 augmente la fluorescence, ce qui peut être interprété comme une augmentation de l'activité du CYP3A6, comme un artéfact ou comme une interférence produite par le SB203580. Le fait que le SKF86002 ne change pas la fluorescence nous permet de conclure que l'augmentation de la fluorescence n'est pas attribuée à l'inhibition de la voie du p38 MAPK. Les expériences décrites dans cette section ont été réalisées pour déterminer si le SB203580 change l'activité du CYP3A6 et de la NADPH-réductase.

Lorsque l'on ajoute du DPI au milieu d'incubation des hépatocytes pendant 24 heures, l'activité du CYP3A6 diminue de 90% ($p < 0,001$) et l'activité de la NADPH-réductase diminue de 94% ($p < 0,001$). Le SB203580 incubé avec des H_{CONT} pendant 24 heures augmente l'activité apparente (la fluorescence) du CYP3A6 de 127% ($p < 0,001$), le SB203580 ne produit aucun changement de l'activité de la NADPH-réductase. Par rapport aux H_{CONT}, la combinaison SB203580 + DPI diminue l'activité apparente du CYP3A6 de 64% ($p < 0,05$) et diminue l'activité de la NADPH-réductase de 99% ($p < 0,05$) (Tableau 3).

	H _{CONT}	DPI	SB203580	SB + DPI
Activité CYP3A6	4957 ± 858	476 ± 65**	11267 ± 822**	1804 ± 463*
Activité NADPH-R	149,3 ± 20,6	8,7 ± 7,1**	142,2 ± 30,7	1,5 ± 1,5*

Tableau 3. Activités du CYP3A6 et de la NADPH-réductase dans des H_{CONT} en présence ou en absence de DPI (n=5), de SB203580 (n=5) et de la combinaison SB203580 + DPI (n=4) *p<0,05 comparé au H_{CONT} **p<0,001 comparé au H_{CONT}. Le SB203580 est ajouté à temps 0 et le DPI une heure après l'ajout de SB203580 au milieu de culture, pour un total de 24 heures d'incubation.

En comparant l'activité du CYP3A6 et de la NADPH-réductase des H_{CONT} à leurs activités en présence de DPI, ajouté seulement 2 heures avant la fin de 24 heures d'incubation (tableau 4), nous observons une diminution de 89% de l'activité du CYP3A6 (p<0,005) et une diminution de 84% (p<0,001) de l'activité de la NADPH-réductase. Le SB203580 augmente l'activité apparente du CYP3A6 de 227% (p<0,001), mais n'a aucun effet sur l'activité de la NADPH-réductase. L'augmentation de l'activité du CYP3A6 produit par le SB203580 est conservée en présence de DPI, ajouté 22 heures après le début de l'incubation avec le SB203580. L'activité de la NADPH-réductase n'est pas affectée par la combinaison SB203580 + DPI, c'est-à-dire la diminution de 89% (p<0,05), produite par le DPI est toujours observée.

Par ailleurs, le pHMB, un inhibiteur du cytochrome *b*₅, incubé avec des H_{CONT}, ne produit aucun changement significatif de l'activité du CYP3A6 ou de l'activité de la NADPH-réductase. L'ajout de DPI et de pHMB 2 heures avant la fin du 24 heures d'incubation, diminue l'activité du CYP3A6 de 90% (p<0,001) et de l'activité de la NADPH-réductase de 90% (p<0,001). L'ajout du pHMB 22 heures après le SB203580, n'augmente pas l'activité de la NADPH-réductase. Le SB203580,

incubés 24 heures, n'augmente pas l'activité du cytochrome b_5 . Il est à noter que ni le DPI, ni le SB203580 ne change l'activité du cytochrome b_5 et que le pHMB diminue l'activité de cette protéine de 74% ($p < 0,05$) (tableau 4).

	H _{CONT}	DPI (2h)	SB203580 (24h)	SB (24h) + DPI (2h)
Activité CYP3A6	4452 ± 240	496 ± 75*	16444 ± 2677*	14003 ± 2123*
Activité NADPH-R	185,6 ± 21,4	29,0 ± 2,4**	195,7 ± 13,7	20,9 ± 7,0**
Activité cytochrome b_5	162,4 ± 17,0	128,8 ± 3,9	174,2 ± 17,7	119,9 ± 26,4

	H _{CONT}	pHMB (2h)	DPI (2h)+ pHMB (2h)	SB (24h) + pHMB (2h)
Activité CYP3A6	4452 ± 240	5455 ± 871	650 ± 81*	15608 ± 3840*
Activité NADPH-R	185,6 ± 21,4	176,3 ± 20,0	18,6 ± 3,8**	186,6 ± 21,5
Activité cytochrome b_5	162,4 ± 17,0	64,5 ± 37,2*	60,3 ± 14,1	95,5 ± 22,0

Tableau 4. Activités du CYP3A6, de la NADPH-réductase et du cytochrome b_5 dans des H_{CONT} en présence ou en absence de DPI (n=5), de SB203580 (n=5), de pHMB (n=3) et de la combinaison de ces produits, SB203580 + DPI (n=4), DPI + pHMB (n=4) et SB203580 + pHMB (n=4). * $p < 0,05$ comparé au H_{CONT}, ** $p < 0,001$ comparé au H_{CONT}. Dans ces expériences, le DPI et le pHMB sont ajoutés au milieu de culture 22 heures après le SB203580, c'est-à-dire 2 heures avant la fin de l'incubation.

Le SKF86002, un inhibiteur de la voie du p38 MAPK, ne modifie pas l'activité de base du CYP3A6 ni celle de la NADPH-réductase. Lorsque le SKF86002 est incubé pendant 24 heures et que le DPI est ajouté à la 22^{ème} heure, l'activité du CYP3A6 diminue de 72% ($p < 0,05$) (tableau 5). Par contre, si le SKF86002 est incubé pendant 24 heures et que le pHMB est ajouté à la 22^{ème} heure, l'activité du CYP3A6 n'est pas modifiée de l'activité de base des H_{CONT}. L'activité de la NADPH-réductase

n'est pas affectée par la présence de SKF86002. L'ajout du pHMB à la 22^{ème} heure n'entraîne aucun changement de l'activité de la NADPH-réductase (tableau 5).

	H _{CONT}	DPI	SKF	SKF + DPI
Activité CYP3A6	1181 ± 261	309 ± 17*	1566 ± 454	329 ± 25*
Activité NADPH-R	145,7 ± 27,5	12,9 ± 1,4**	133,8 ± 8,0	12,4 ± 2,4**

	H _{CONT}	pHMB	DPI + pHMB	SKF + pHMB
Activité CYP3A6	1181 ± 261	1331 ± 266 (n=2)	298 ± 17*	1479 ± 330
Activité NADPH-R	145,7 ± 27,5	136,5 ± 7,8	13,7 ± 2,5**	129,6 ± 10,3

Tableau 5. Activités du CYP3A6 et de la NADPH-réductase dans des H_{CONT} en présence ou en absence DPI, de SKF86002, de pHMB ou d'une combinaison de ses produits (n=3). *p<0,05 comparé au H_{CONT}, **p<0,001 comparé au H_{CONT}. Dans ces expériences, le DPI et le pHMB sont ajoutés au milieu de culture 22 heures après le SKF86002, c'est-à-dire 2 heures avant la fin de l'incubation.

En conclusion, l'inhibition de la voie du p38 MAPK par le SB203580 et le SKF86002 ne change pas l'activité de base de la NADPH-réductase. Ces expériences nous confirment que le SB203580 émet une fluorescence affectant la lecture d'activité du CYP3A6. Cette fluorescence est présente lorsque l'on incube le SB203580 dans du tampon Krebs ainsi que dans du milieu de culture avec (figure 30) ou sans hépatocytes (figure 29).

7. Effet de l'IL-6 en présence d'inhibiteurs de la p38 MAPK sur l'activité de la NADPH-réductase

L'incubation de l'IL-6 avec des H_{CONT} pendant 24 heures n'a pas diminuée l'activité du CYP3A6. Le SB203580 augmente l'activité de 237% (p <0,05) et en présence de SB203580, l'IL-6 parvient pas à diminuer l'activité du CYP3A6 qui par rapport aux témoins est de 300% (p > 0,005) (figure 32). Par ailleurs, l'ajout du SKF86002 au

milieu d'incubation des H_{CONT} ne change pas l'activité du CYP3A6 de façon significative (figure 33).

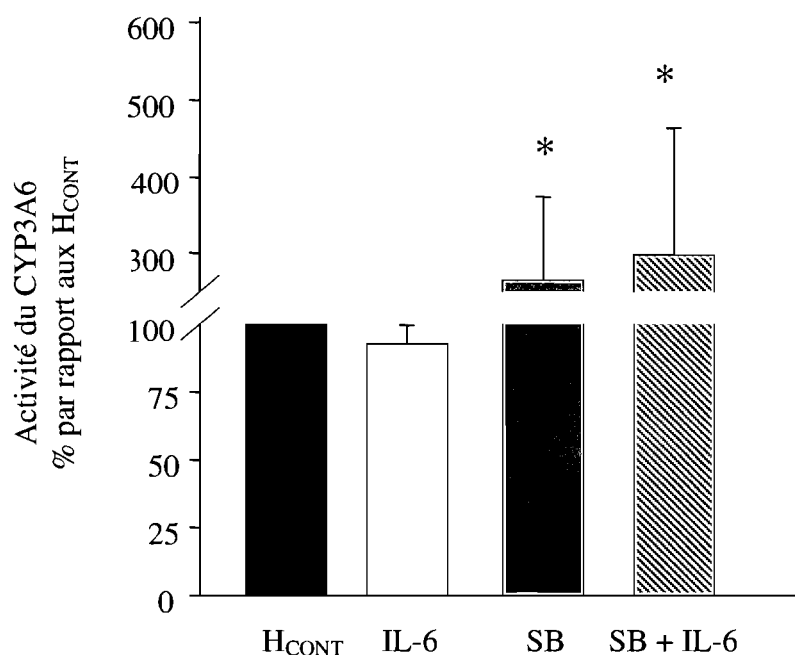


Figure 32. Rapport de l'activité du CYP3A6 dans des H_{CONT} (3155 ± 843) ■, en présence d'IL-6 □ (n=5), de SB203580 ■ (n=8) et une combinaison SB203580 et IL-6 (n=6). ▨ *p < 0,05 comparé à H_{CONT}

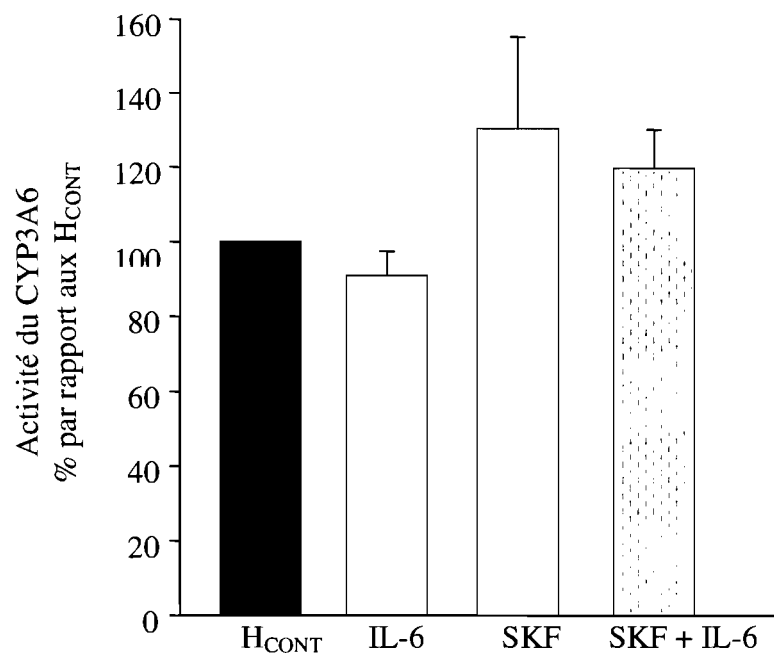


Figure 33. Rapport de l'activité du CYP3A6 dans des hépatocytes procédant de lapins témoins (H_{CONT}) (1181 ± 260) ■, en présence d'IL-6 □, de SKF □ et une combinaison SKF et IL-6 □, (n=3) *p < 0,05 comparé à H_{CONT}

Cette étude préliminaire nous a permis de constater que l'incubation d'IL-6 à 10 ng/mL pendant 24 heures ne diminue pas l'activité du CYP3A6. Les résultats des tests statistiques ne sont pas assez puissants pour conclure sur l'effet de l'IL-6 et du SB203580 sur l'activité du CYP3A6. Cependant, cette étude nous permet d'observer l'absence d'effet du SKF86002 sur l'activité du CYP3A6.

En tenant compte que l'IL-6 diminue l'activité de la NADPH-réductase, nous avons voulu étudier l'effet de l'inhibition de la voie de la p38 MAPK sur la diminution de l'activité de la NADPH-réductase produite par l'IL-6. Le SB203580 et le SKF86002 ont été incubés avec des H_{CONT} pendant 24 heures. L'IL-6 diminue l'activité de la NADPH-réductase de 18% ($p < 0,05$) et le SB203580 n'empêche pas la diminution de l'activité de la NADPH-réductase ($p < 0,05$) (figure 34). Des résultats semblables sont observés avec le SKF86002.

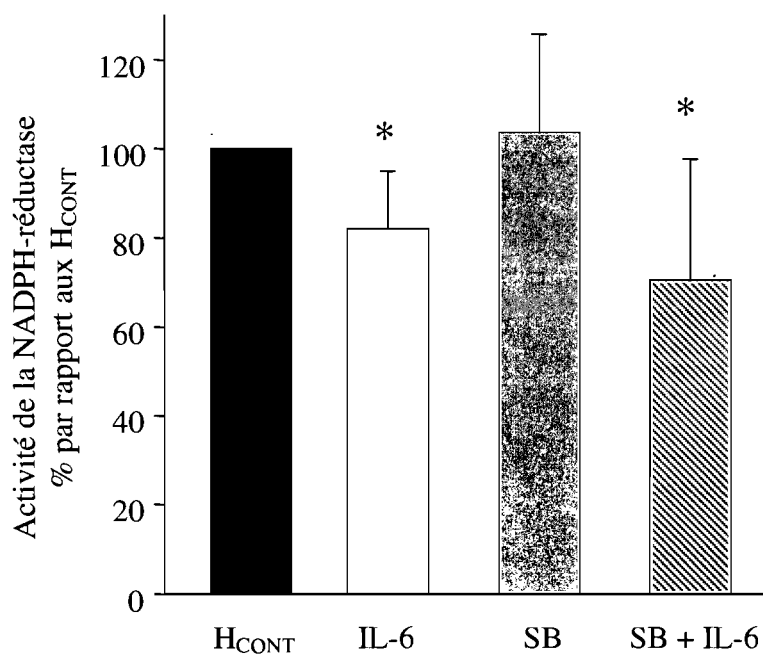


Figure 34. Rapport de l'activité de la NADPH-réductase dans des H_{CONT} (125 ± 45) ■, en présence d'IL-6 □ (n=10), de SB203580 □ (n=14) et la combinaison SB203580 et IL-6 ▨ (n=8). *p < 0,05 comparé à H_{CONT}

Ces expériences démontrent que la diminution de l'activité de la NADPH-réductase produite par l'IL-6 n'est pas médiée par la p38 MAPK.

8. Étude de l'activité de la NADPH-réductase en présence d'IL-6 et de plusieurs inhibiteurs des protéines kinases

L'objectif de ce groupe d'expériences était de caractériser les voies de signalisations régulant l'activité de la NADPH-réductase de base et après l'exposition à l'IL-6. Nous avons déjà observé que la voie de signalisation de la p38 MAPK n'est pas impliquée dans la régulation de l'activité de la NADPH-réductase. Les voies de signalisation étudiées dans cette section sont la voie du PI₃K inhibée par la wortmanine et le LY294002, la voie des ERK inhibée par le PD098059 et la voie de JAK/STAT inhibée par le piceatannol. Par ailleurs, nous avons utilisé le pyrrolidine dithiocarbamate pour inhiber l'activation du NF-κB.

L'IL-6 diminue l'activité de la NADPH-réductase de 22% (p < 0,05). Aucun changement d'activité de la NADPH-réductase n'a été détecté par l'inhibition de la voie du PI₃K par la wortmanine et par le LY294002. La wortmanine et le LY294002 préviennent la diminution de l'activité de la NADPH-réductase produite par l'IL-6.

L'inhibition du MEKK et ainsi l'activation de ERK 1/2, par le PD098059 et l'inhibition de la voie de JAK/STAT par le piceatannol diminuent l'activité de la NADPH-réductase de 32% et 24% respectivement ($p < 0,05$). L'exposition des H_{CONT} à l'IL6, au PD098059 et au piceatannol diminue l'activité de la NADPH-réductase de 47% et 51% respectivement ($p < 0,05$) (figure 35). Finalement, le pyrrolidine dithiocarbamate diminue l'activité de la NADPH-réductase d'environ 50% ($p < 0,05$); le pyrrolidine dithiocarbamate en présence d'IL-6 diminue l'activité de la NADPH-réductase de 65% ($p < 0,05$).

Afin d'étudier l'effet de des inhibiteurs sur la diminution de l'activité de la NADPH-réductase par l'IL-6, les valeurs d'activité obtenues pour les différents inhibiteurs ont été appariées aux valeurs d'activité en présence de la combinaison de l'inhibiteur et de l'IL-6. Puisqu'il n'y a aucun changement d'activité détectée entre les inhibiteurs respectifs et leurs combinaisons : wortmaninne et IL-6, LY294002 et IL-6, PD098059 et IL-6 ainsi que piceatannol et IL-6 nous pouvons conclure que l'inhibition des voies de signalisations de la PI₃K, de la JAK/STAT et des ERK 1/2 sont impliquées dans la diminution d'activité produite par l'IL-6. Par ailleurs, la voie des ERK paraît nécessaire à l'activité de base de la NADPH-réductase; de même, l'activité de base de la NADPH-réductase serait bloquée par le pyrrolidine dithiocarbamate (figure 35). La diminution de l'activité de base par ces produits pourrait être due à la présence de métabolites du PD098059 et du pyrrolidine dithiocarbamate. Les métabolites peuvent provenir de la dégradation des produits

incubés dans les hépatocytes car ils sont en présence des enzymes responsable de la dégradation des médicaments.

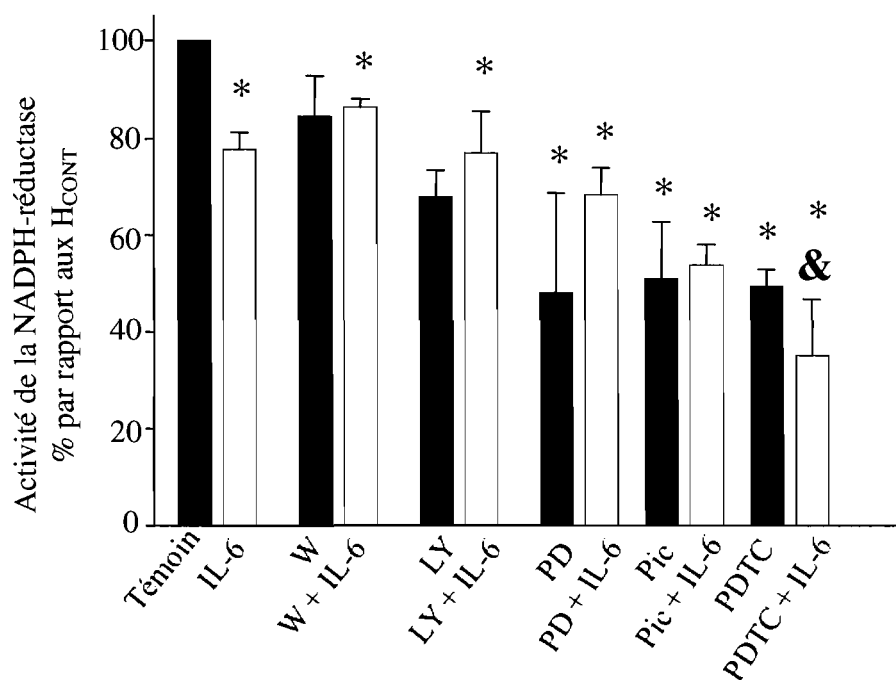


Figure 35. Activité de la NADPH-réductase dans des H_{CONT} (181 ± 41) ■ en présence d'IL-6 □ et des inhibiteurs de plusieurs voies de signalisation (n = 4) *p < 0,05 comparé à H_{CONT}. & p < 0,05 comparé à IL-6 où W = wortmanine, LY = LY294002, PD = PD098059 et Pic = piceatannol et PDTC = pyrrolidine dithiocarbamate.

9. Modulation de l'activité et de la NADPH-réductase par les protéines phosphatases.

Les études précédentes suggèrent que les voies de JAK/STAT et des ERK sont nécessaires pour le maintien de l'activité de base de la NADPH-réductase. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation est nécessaire à l'activité de cet enzyme. L'objectif des expériences était de confirmer que la phosphorylation module l'expression et l'activité de la NADPH-réductase. Nous avons étudié le rôle des protéines phosphatases dans la modulation de l'activité du CYP3A6 et de la NADPH-réductase. Pour ce faire, nous avons incubé des H_{CONT} en présence des

deux inhibiteurs de protéines phosphatases, l'acide okadaïque et la calyculine A, pendant 24 et 48 heures.

a. NADPH-Réductase

Les résultats présentés dans les figures 36 et 37 illustrent les changements de l'activité, de l'expression et de la quantité d'ARN messenger de la NADPH-réductase suite à 24 et 48 heures d'incubation en présence des inhibiteurs des protéines phosphatases.

Après 24 heures d'incubation, l'inhibition des phosphatases par l'acide okadaïque ne produit aucun effet significatif sur l'activité, l'expression et la quantité d'ARN messenger de la NADPH-réductase. La calyculine A diminue l'activité de la NADPH-réductase de 35% ($p < 0,05$), mais ne produit aucun changement significatif de l'expression et de l'ARN messenger (figure 36).

Lorsque l'acide okadaïque et de la calyculine A sont incubés pendant 48 heures avec des H_{CONT} , l'activité de la NADPH-réductase est diminuée de 64% ($p < 0,05$) par l'acide okadaïque et de 70% ($p < 0,05$) par la calyculine A. Par rapport à l'expression de la NADPH-réductase obtenue dans des H_{CONT} , l'incubation des H_{CONT} avec l'acide okadaïque ou la calyculine A ne change pas l'expression de la NADPH-réductase (figure 37, panneau B). La quantité d'ARN messenger de la *NADPH-réductase* est diminuée de 52% ($p < 0,05$) et de 48% ($p < 0,05$) suite à l'inhibition des protéines phosphatases par l'acide okadaïque et la calyculine A, respectivement (figure 37, panneau C).

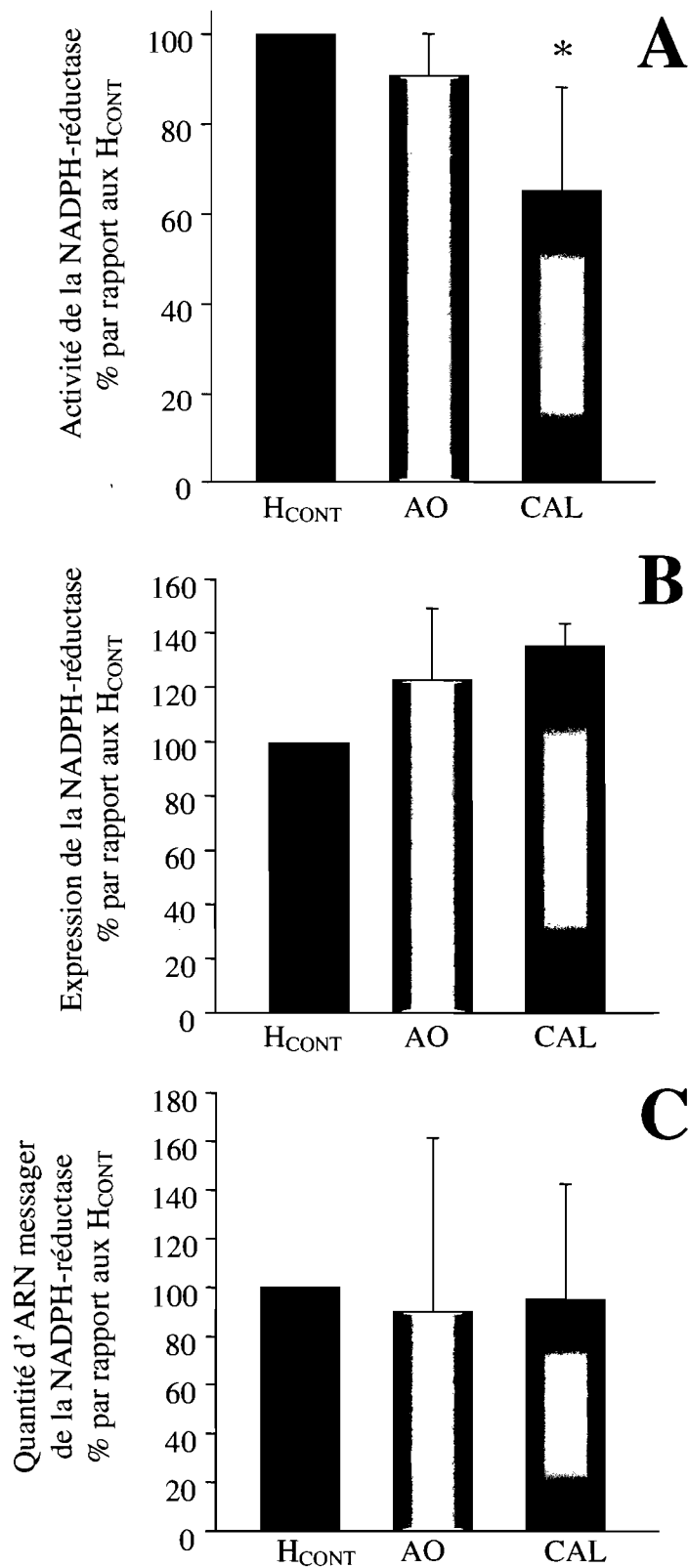


Figure 36. (A) Activité (312 ± 36), (B) expression protéique (278381 ± 18577) et (C) ARN messenger de la NADPH-réductase des H_{CONT} ■ incubés pendant 24 heures en présence d'acide okadaïque (AO) □ et en présence du calyculine A (CAL) ▣. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. * $p < 0,05$ comparé à H_{CONT} (n=3)

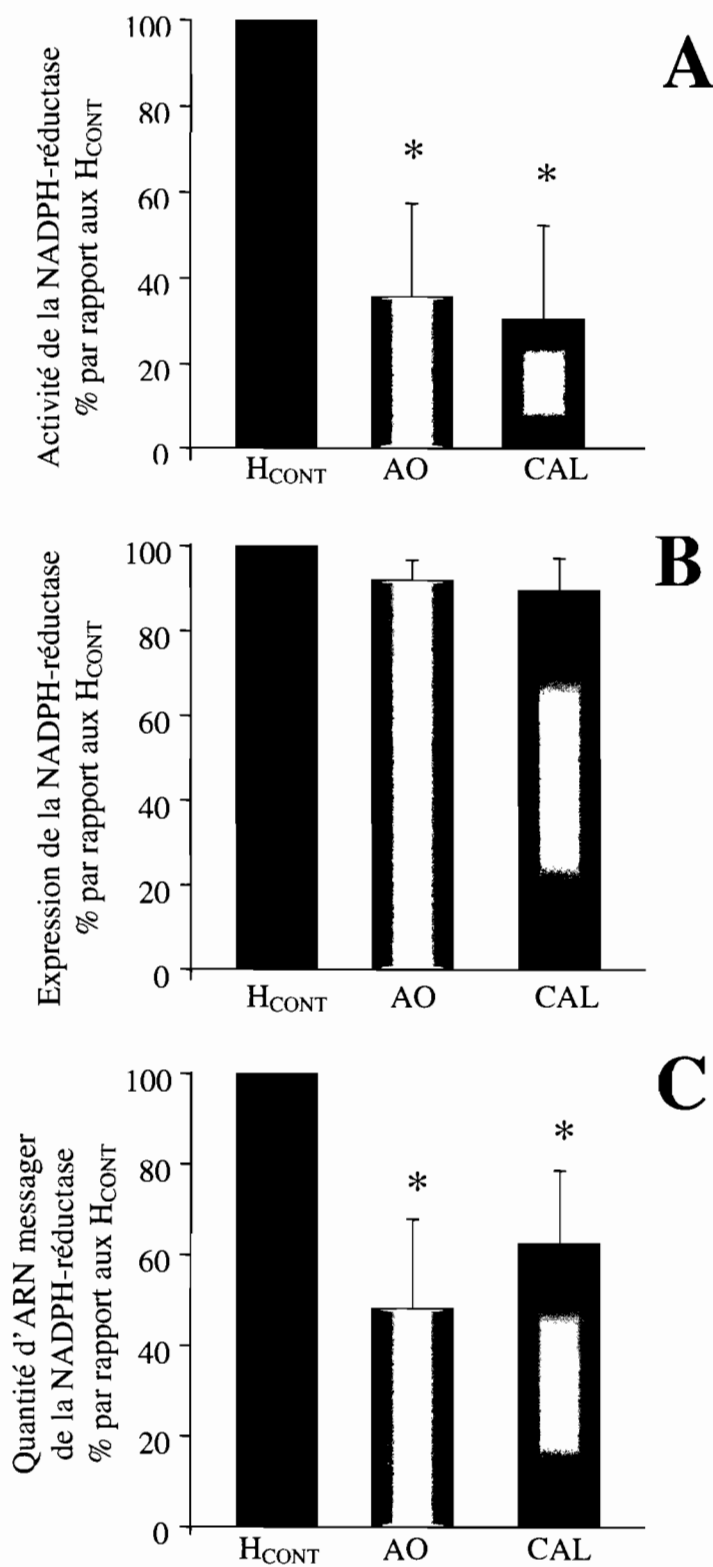


Figure 37. (A) Activité (210 ± 24), (B) expression protéique (413382 ± 13250) et (C) ARN messenger de la NADPH-réductase dans des H_{CONT} ■ incubés pendant 48 heures en présence d'acide okadaïque (AO) □ et en présence du calyculine A (CAL) ▣. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. *p < 0,05 comparé à H_{CONT} (n=3)

b. CYP3A6

La figure 38 illustre l'effet de l'inhibition des protéines phosphatases par l'acide okadaïque et de la calyculine A sur l'activité, l'expression et la quantité d'ARN messager du *CYP3A6* dans des H_{CONT} suite à une période d'incubation de 24 heures. La calyculine A diminue l'activité du CYP3A6 de 60% ($p < 0,05$), cependant, l'acide okadaïque ne modifie pas l'activité du CYP3A6 (figure 38, panneau A). L'expression, (panneau B) et l'ARN messager du *CYP3A6* (panneau C) ne subissent aucun changement par la présence d'inhibiteurs des protéines phosphatase.

Lorsque les inhibiteurs des protéines phosphatases sont incubés pendant 48 heures avec des H_{CONT}, l'activité du CYP3A6 diminue de 48% ($p < 0,05$) en présence d'acide okadaïque et de 70% ($p < 0,05$) en présence de calyculine A. L'expression du CYP3A6 dans les H_{CONT} (figure 39, panneau B) n'a pas été changée par l'acide okadaïque ou la calyculine A. De même, l'inhibition des protéines phosphatase ne change pas la quantité d'ARN messager du *CYP3A6*.

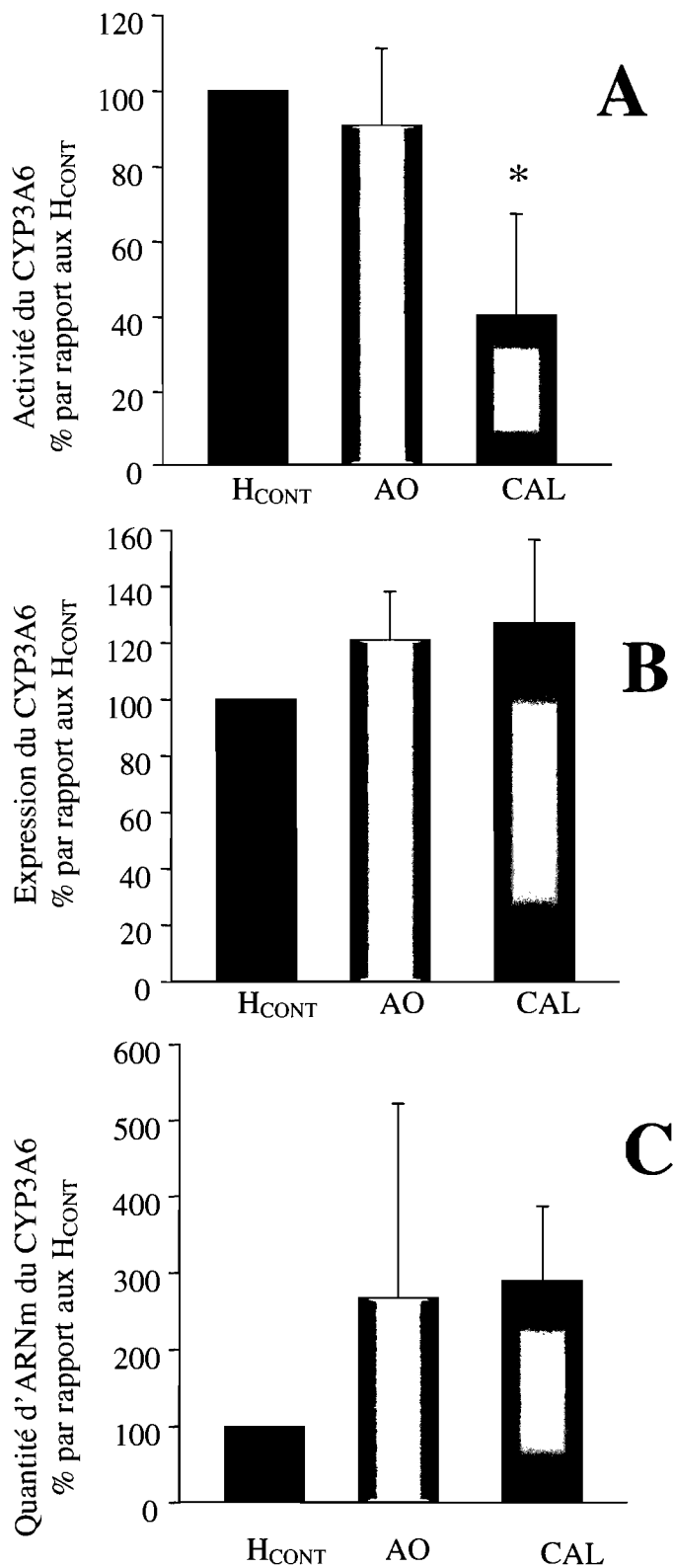


Figure 38. (A) Activité (5997 ± 861), (B) expression protéique (185701 ± 20369) et (C) ARN messager du CYP3A6 dans des H_{CONT} ■ incubés pendant 24 heures en présence d'acide okadaïque □ et en présence du calyculine A □. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. * p < 0,05 comparé à H_{CONT} (n=3)

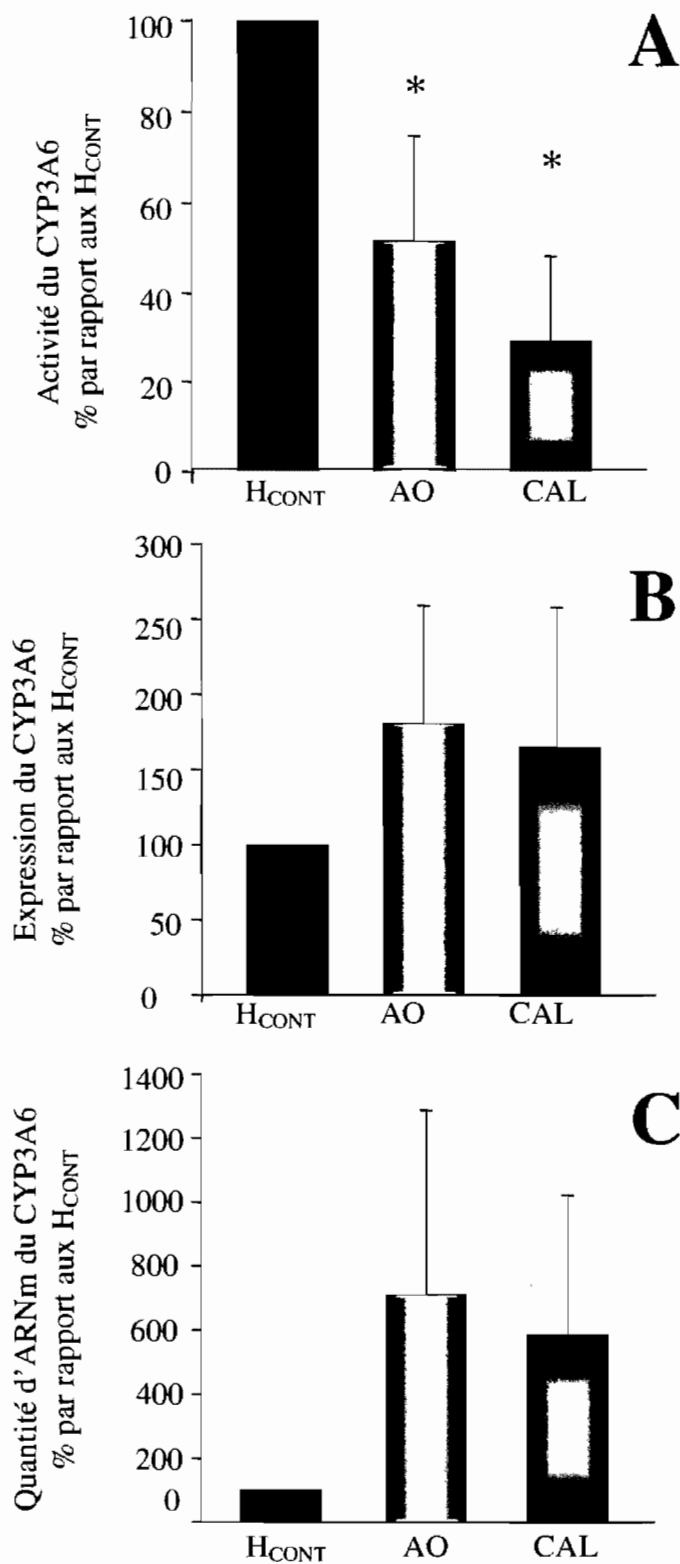


Figure 39. (A) Activité, (B) expression protéique (140135 ± 30665) et (C) ARN messenger du CYP3A6 dans des H_{CONT} (2967 ± 127) ■ incubés pendant 48 heures en présence d'acide okadaïque □ et en présence du calyculine A ▣. L'ARN est calculé à l'aide d'un calibrateur qui est notre contrôle, aucune variation ne peut être calculée. * $p < 0,05$ comparé à H_{CONT} (n=3)

10. Étude de l'activité de la NADPH-réductase en présence de calyculine A et d'inhibiteurs des protéines kinases

Les expériences précédentes démontrent que l'inhibition des protéines phosphatases diminue l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6. Il est possible que la diminution de l'activité du CYP3A6 soit secondaire à la diminution de l'activité de la NADPH-réductase. Par ailleurs, ces résultats suggèrent que la déphosphorylation de la NADPH-réductase par les protéines phosphatases peut augmenter l'activité de cette enzyme. Les expériences qui suivent avaient pour objectif d'identifier les kinases responsables de la phosphorylation de la NADPH-réductase. Nous avons réalisés des expériences identiques pour mieux caractériser la modulation de l'activité du CYP3A6 par la calyculine A.

Nous avons étudié les changements d'activité et d'expression de la NADPH-réductase et du CYP3A6 en incubant des H_{CONT} pendant 48 heures avec des inhibiteurs de la PKC, de la p38 MAPK, du ERK 1/2, du PI₃K et de la transactivation du NF-κB en présence de calyculine A.

a. NADPH-réductase

La calyculine A diminue l'activité de la NADPH-réductase d'environ 73% ($p < 0,05$) et ce même en présence des inhibiteurs des voies de signalisation. En absence de calyculine A, le pyrrolidine dithiocarbamate diminue l'activité de la NADPH-réductase de 63% ($p < 0,05$) dans les H_{CONT}. Cependant, le pyrrolidine

dithiocarbamate n'a pas empêché la réduction de l'activité de la NADPH-réductase produite par la calyculine A. L'inhibition de la PKC, de la PI₃K, des ERK 1/2 et de la p38 MAPK n'a pas prévenu la diminution d'activité de la NADPH-réductase produite par la calyculine A (figure 40, panneau A).

L'inhibition des protéines phosphatases par la calyculine A ne change pas l'expression de la NADPH-réductase. Lorsque les voies de signalisations PKC, PI₃K, p38 MAPK, ERK 1/2 sont inhibées en présence de calyculine A, l'expression de la NADPH-réductase n'est pas modifiée.

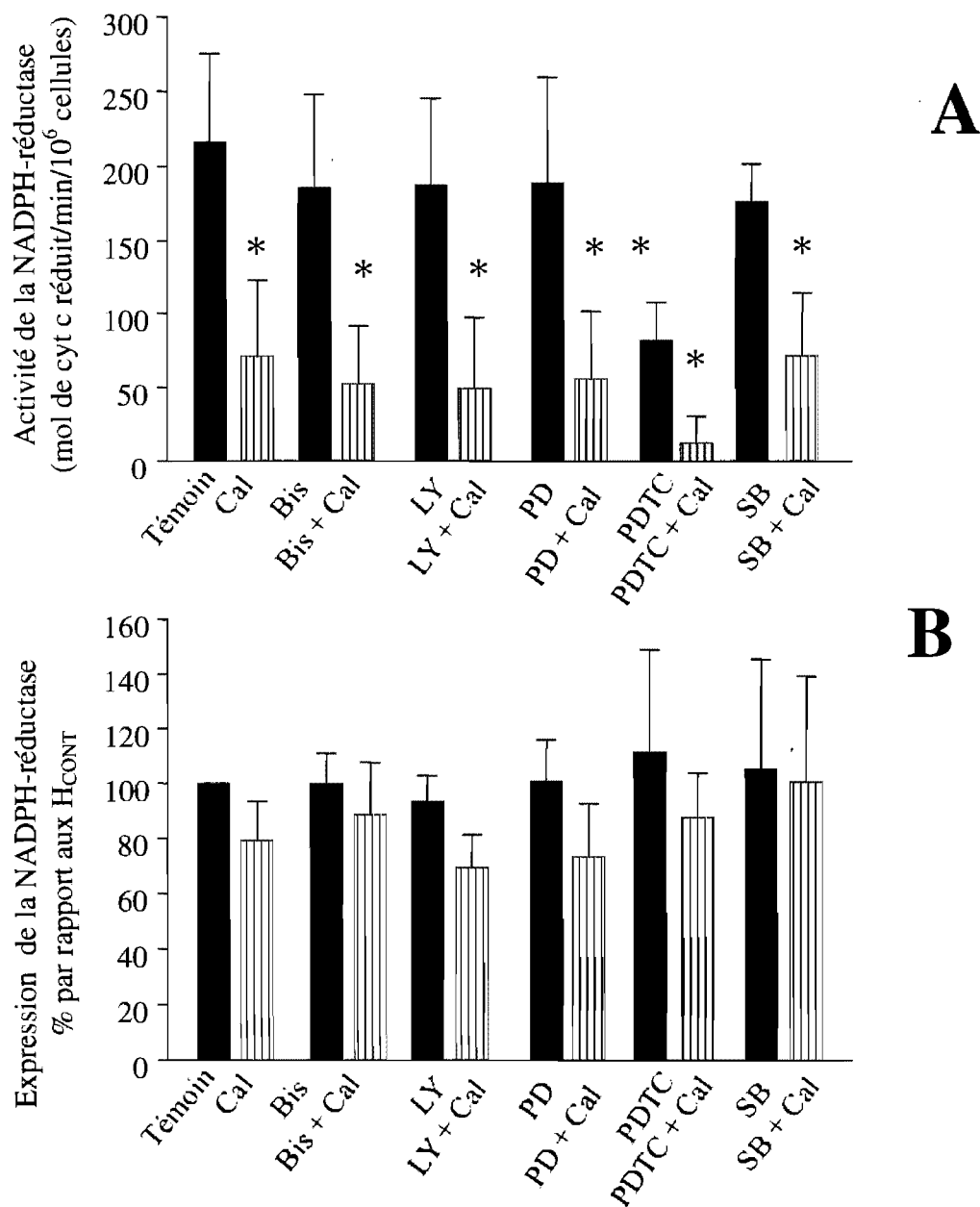


Figure 40. (A) Activité, (B) expression protéique (360579 ± 24424) dans des H_{CONT} ■ incubés pendant 48 heures avec différents inhibiteurs et en présence de calyculine A (Cal) ▨ *p < 0,05 comparé à H_{CONT} (n=3) où Bis = bisindolymaléimide IV, LY = LY294002, PD = PD098059, PDTC = pyrrolidine dithiocarbamate et SB = SB203580.

b. CYP3A6

Nous notons une baisse de l'activité du CYP3A6 de 42% ($p < 0,05$) lorsque les hépatocytes sont incubés avec la calyculine A. L'inhibition de la PKC par le bisindolylmaléimide IV et de la PI₃K par le LY294002 augmente l'activité du CYP3A6 de 35% ($p < 0,05$) et de 30% ($p < 0,05$) respectivement (figure 41, panneau A). La pré-incubation des inhibiteurs de kinases n'empêche pas la diminution de l'activité du CYP3A6 produite par la calyculine A.

En présence de calyculine A, dans les H_{CONT} l'expression du CYP3A6 augmente ($p < 0,05$). Les inhibiteurs de kinases ne changent pas l'expression du CYP3A6 dans les H_{CONT}, à l'exception du SB203580 qui augmente l'expression d'environ 120% ($p = 0,055$). L'inhibition de la PKC, de la PI₃K, des ERK1/2 et de la transactivation du NF- κ B prévient l'augmentation de l'expression du CYP3A6 observée suite à l'incubation d'H_{CONT} avec la calyculine A pendant 48 heures (Figure 41, panneau B).

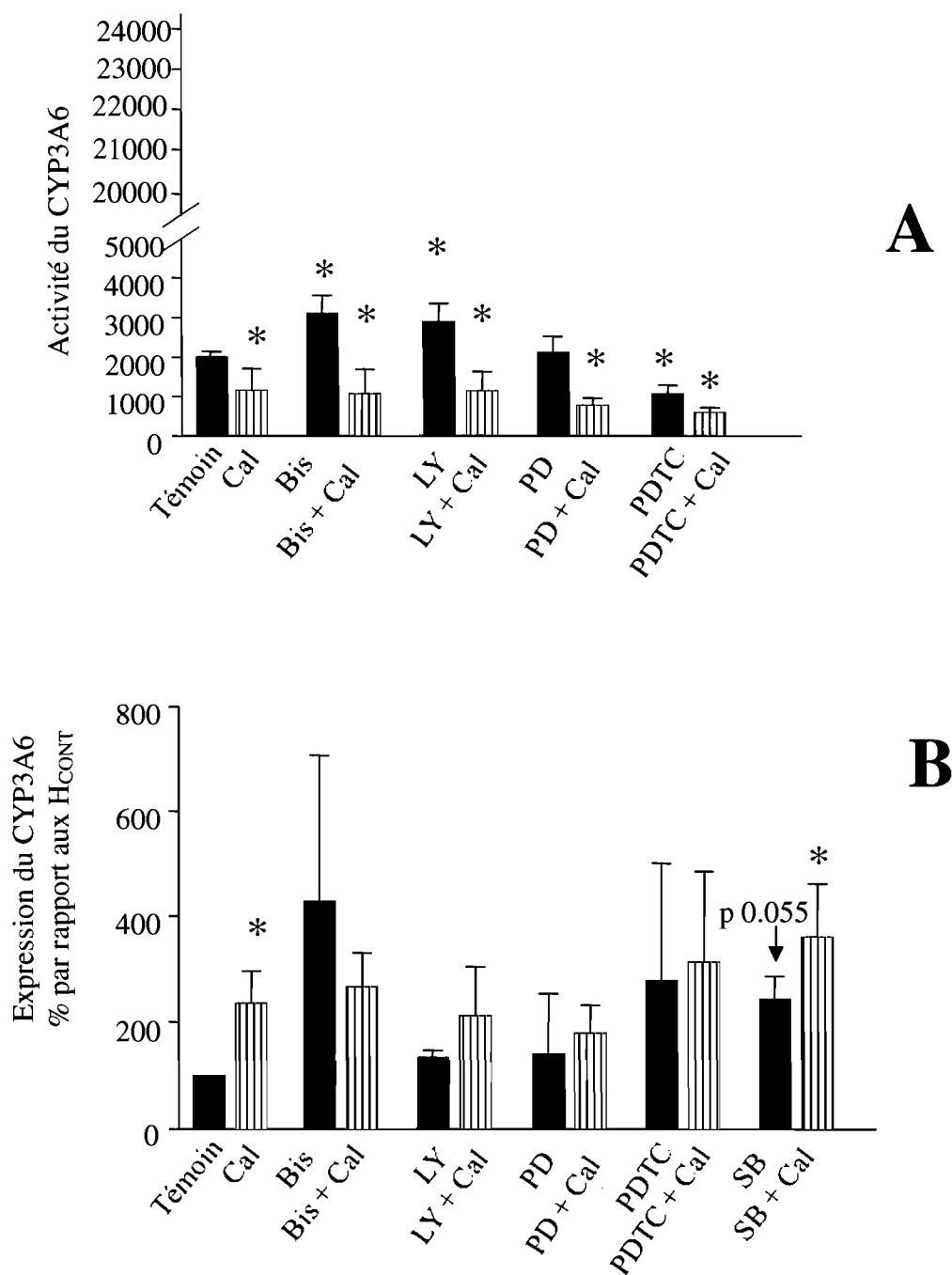


Figure 41. (A) Activité (B) expression protéique (57237 ± 9278) du CYP3A6 dans des H_{CONT} ■, incubés avec différents inhibiteurs, en présence de calyculine A (Cal) ▨ *p < 0,05 comparé à H_{CONT} (n=3) où Bis = bisindolylmaléimide IV, LY = LY294002, PD = PD098059, PDTC = pyrrolidine dithiocarbamate et SB = SB203580.

E. Discussion

Le CYP3A4 est l'isoforme le plus important chez l'humain, car il métabolise plus de 50% des médicaments. Comprendre la régulation et la modulation du CYP3A4 lors d'une réaction inflammatoire aiguë est essentielle pour prévenir les réactions indésirables produites par les médicaments à faible index thérapeutique dont le métabolisme est modifié par une réaction inflammatoire aiguë.

L'activité des enzymes du cytochrome P450 nécessite la NADPH-réductase. La NADPH-réductase est nécessaire pour le transfert d'électrons lors du cycle catalytique des enzymes du cytochrome P450 permettant ainsi de biotransformer des substrats. L'hypothèse de ce projet de recherche est que la réaction inflammatoire, les cytokines et les dérivés radicalaires de l'oxygène relâchés lors de la réaction inflammatoire modifient l'activité de la NADPH-réductase.

L'efficacité des enzymes du cytochrome P450 dépend du ratio de la quantité d'enzymes du cytochrome P450 sur la quantité de NADPH-réductase disponible dans la cellule. Pour observer une activité catalytique optimale le ratio est de 1/2, or dans l'hépatocyte le rapport enzymes du cytochrome P450 sur NADPH-réductase est de 10/1 ou 20/1 (Estabrook et coll., 1971; Yamazaki et coll., 1996), ce qui fait de la NADPH réductase un facteur limitant du cycle catalytique du cytochrome P450. La diminution de l'activité de la NADPH-réductase conduit à la réduction de l'activité du CYP3A6.

Puisque les mécanismes reliés à la baisse d'activité du CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire ne sont pas complètement élucidés, nous nous sommes intéressés à l'effet de la réaction inflammatoire sur l'activité de la NADPH-réductase. La cytokine IL-6 est impliquée dans la diminution de l'activité du CYP3A6 lors d'une réaction inflammatoire aseptique (Bleau et coll., 2000). Par ailleurs, lors de la réaction inflammatoire produite par la térébenthine, l'IL-1 β , l'IL-6 et l'INF- γ , contribuent à diminuer l'expression du CYP3A6 (Bleau et coll., 2003). Nous avons émis l'hypothèse que les cytokines impliquées dans la diminution de l'activité et de l'expression du CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire affectent aussi l'activité et l'expression de la NADPH-réductase.

Il a été démontré que le monoxyde d'azote, produit lors de la réaction inflammatoire, peut contribuer à la diminution de l'activité du CYP3A6 en se fixant à l'hème de la protéine ou en nitrotyrosilant la protéine (Minamiyama et coll., 1997). Ces observations nous induisent à soulever l'hypothèse que le monoxyde d'azote peut inhiber l'activité de la NADPH-réductase. En plus des cytokines et du monoxyde d'azote, le peroxyde d'hydrogène produit lors du cycle catalytique des enzymes du cytochrome P450 et de la réaction inflammatoire pourrait réduire l'activité de la NADPH-réductase. Flowers et Miles ont démontré que le peroxyde d'hydrogène diminue le métabolisme du benzo[a]pyrène en inhibant l'activité de la NADPH-réductase (Flowers et Miles, 1991). En conséquence, nous avons étudié l'effet du monoxyde d'azote et du peroxyde d'hydrogène sur l'activité de la NADPH-réductase.

En 1987, Pyerin et coll. ont démontré que l'ajout de protéines phosphatases aux microsomes de rats diminue l'activité de la NADPH-réductase sans changer l'activité des enzymes du cytochrome P450 et que l'ajout de protéines kinases aux microsomes favorise la phosphorylation des enzymes du cytochrome P450 sans modifier l'état de phosphorylation de la NADPH-réductase (Pyerin et coll., 1987). Afin de mieux comprendre les voies de signalisations contrôlant l'activité de la NADPH-réductase, nous avons étudié le rôle des protéines phosphatases et des protéines kinases sur l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6.

La figure 42 résume les expériences réalisées afin de mieux comprendre la régulation de la NADPH-réductase et son interaction avec le CYP3A6.

Peu d'études ont été menées dans le but de comprendre l'effet de la réaction inflammatoire sur l'activité de la NADPH-réductase. L'injection de lipopolysaccharides (LPS) diminue l'activité de la NADPH-réductase; de plus, l'injection de térébenthine à des rats, ne paraît pas diminuer l'activité de la NADPH-réductase (Morgan, 1989). Par contre, de nombreuses études se sont intéressées à l'effet de la réaction inflammatoire sur le CYP3A6. Ainsi, l'injection de LPS diminue l'expression du CYP3A2 (un homologue du CYP3A6) chez le rat (Sewer et coll., 1996) et de fortes doses de LPS diminuent la quantité de CYP3A1 (homologue du CYP3A4 de l'humain) chez la souris (Stanley et coll., 1988). La réaction inflammatoire aseptique provoquée par l'injection sous-cutanée de térébenthine

entraîne la diminution de la quantité des CYP1A1/2 et CYP3A6 chez le lapin (Kurdi et coll., 1999).

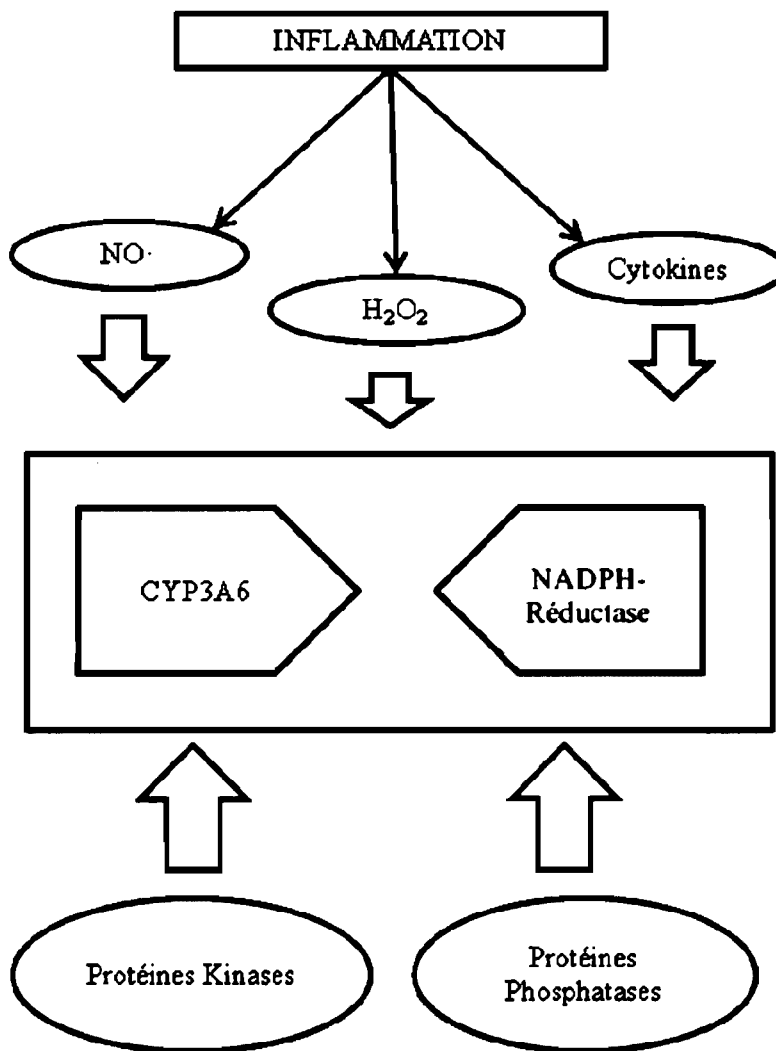


Figure 42. Schéma résumant les différentes conditions expérimentales étudiées, susceptibles de modifier l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6.

Dans le modèle utilisé pour notre étude, nous avons induit une réaction inflammatoire en injectant de la térébenthine par voie sous-cutanée à des lapins. Les hépatocytes ont été isolés 48 heures après l'injection de la térébenthine et incubés pendant 48 heures, lorsque l'activité, l'expression et la quantité d'ARN messenger de la NADPH-réductase et du CYP3A6 ont été mesurées. Les résultats obtenus démontrent que la réaction inflammatoire diminue l'activité de la NADPH-réductase. Cette diminution d'activité est attribuable à la baisse d'expression de la protéine secondairement à la diminution de la quantité d'ARN messenger c'est-à-dire, la réaction inflammatoire diminue l'expression de la NADPH-réductase par un mécanisme pré-transcriptionnel.

La baisse d'activité enzymatique du CYP3A6 par la réaction inflammatoire est plus grande (150%) que la baisse d'expression du CYP3A6, suggérant qu'en plus des changements pré-transcriptionnels mis en évidence par la baisse d'expression, la diminution de l'activité du CYP3A6 est secondaire à d'autres causes. Il a été rapporté que chez des souris knock-out pour le gène de la NADPH-réductase hépatique, le manque de NADPH-réductase diminue radicalement l'activité des enzymes du cytochrome P450 (Henderson et coll., 2003). En conséquence, la réduction de l'activité du CYP3A6 est possiblement secondaire à des changements post-transcriptionnels, tels un ralentissement du cycle catalytique par la diminution de l'activité de la NADPH-réductase.

L'utilisation de souris knock-out pour les gènes de l'IL-6 ou de l'IL-1 β démontre que, suite à l'injection de térébenthine chez la souris, l'augmentation de l'expression de l'IL-6 dépend de l'IL-1 β et que l'IL-1 β est essentielle à la phase aiguë de la réaction inflammatoire (Fantuzzi et Dinarello, 1996). Par ailleurs, lors de la réaction inflammatoire aseptique, l'IL-6 diminue l'activité du CYP3A6 et l'IL-6, l'IFN- γ et l'IL-1 β diminuent l'expression du CYP3A6 (Bleau et coll., 2000, 2003). Ces données soulèvent la possibilité que l'IL-6 et l'IL-1 β soient impliquées dans la diminution de l'activité et de l'expression de la NADPH-réductase lors de la réaction inflammatoire aseptique produite par la térébenthine.

Supportant la possibilité que des cytokines puissent être responsables de la diminution de l'activité de la NADPH-réductase, il a été rapporté que l'administration d'IL-1 α à des rats entraîne une diminution de l'activité de la NADPH-réductase, 24 heures après l'administration de la cytokine (Sindhu et coll., 1996). Dans notre étude, l'incubation des hépatocytes en présence d'IL-1 β et d'IL-6 pendant 48 heures, diminue l'activité de la NADPH-réductase; par contre, la présence d'IFN- γ et de TNF- α ne modifie pas l'activité de la NADPH-réductase. De même, l'IL- β et l'IL-6, mais pas l'IFN- γ ni le TNF- α , diminuent l'activité du CYP3A6. Ces résultats démontrent que l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6 sont diminuées par les mêmes conditions expérimentales, appuyant l'hypothèse que la diminution de l'activité de la NADPH-réductase par la réaction inflammatoire pourrait contribuer à la réduction de l'activité du CYP3A6.

L'effet de l'IL-1 β et l'IL-6 sur l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6 serait en partie secondaire au fait que ces cytokines diminuent l'expression de la NADPH-réductase et du CYP3A6. Nos résultats démontrent que l'IL-6 et l'IL-1 β diminuent l'expression de la NADPH-réductase et que l'IL-1 β diminue la quantité d'ARN messager de la *NADPH-réductase*. L'IFN- γ et le TNF- α ne produisent aucun changement significatif de l'expression de la NADPH-réductase. Parallèlement, l'IL-6 et l'IL-1 β diminuent l'expression et la quantité d'ARN messager du CYP3A6, contrairement à l'IFN- γ et au TNF- α qui n'altèrent pas l'expression du CYP3A6. Ces résultats sont en accord avec le rapport indiquant que l'IL-1 β de même que l'IL-6 et le TNF- α diminuent l'expression des CYP1A1/1A2 et CYP3A dans des hépatocytes d'humains en culture primaire (Abdel-Razzak et coll., 1993).

Il est à noter que les tests statistiques de l'activité et de l'expression de la NADPH-réductase et du CYP3A6 en présence d'IFN- γ et de TNF- α n'ont pas une puissance assez élevée pour détecter un effet significatif, nous ne pouvons donc pas conclure sur l'effet de ces inhibiteurs sur l'activité et l'expression de la NADPH-réductase et du CYP3A6.

Bien que le rôle de l'IL-6 et de l'IL-1 β dans la diminution de l'activité et de l'expression des enzymes du cytochrome P450 soit bien décrit, les mécanismes sous-jacents à la diminution de l'expression des enzymes du P450 sont moins bien caractérisés. Il a été proposé que l'IL-6 active la kinase JAK, qui à son tour active

STAT3 qui stimule PI₃K. La PI₃K stimule la voie d'Akt qui active la ERK 1/2, la p38 MAPK et la JNK, kinases qui activent le facteur de transcription *c-myc* et l'AP-1 qui irait se fixer à l'élément de réponse hépatique du gène des cytochromes P450 (Lee et coll., 2007). Par ailleurs, dans des hépatocytes d'humains en culture primaire, l'IL-6 diminue l'ARN messenger du PXR et de CAR, récepteurs nucléaires impliqués dans la modulation du CYP3A (Pascusi et coll., 2000). D'un autre coté, il a été démontré que la diminution de l'expression du CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire par l'IL-6 n'implique pas la voie des STAT ni la voie des ERK, mais passe par l'induction de C/EBP β -LIP protéine qui régule négativement la transcription du gène (Jover et coll., 2002).

L'IL-1 β a aussi l'habileté de diminuer l'expression des enzymes du cytochrome P450. Dans des hépatocytes humains, l'IL-1 β diminue la quantité d'ARN messenger des CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 et CYP3A. En réponse au phénobarbital, les niveaux d'ARN messenger des enzymes du cytochrome P450 s'élèvent et cette augmentation d'expression est inhibé par l'IL-1 β (Abdel-Razzak et coll., 1993, 1995). De même, dans des hépatocytes humains préalablement incubés avec du phénobarbital, l'IL-1 β diminue l'expression de CAR et diminue l'ARN messenger du CYP3A (Assenat et coll., 2004). Les voies de signalisations activées par l'IL-1 β inclurait la p38 MAPK, les ERK 1/2 et la JNK qui elles, activeraient les facteurs de transcription NF- κ B et l'AP-1 qui après translocation, se fixerait à l'élément de réponse négative des gènes de l'isoforme du cytochrome P450 (Iber et coll., 2000).

Lors d'une réaction inflammatoire, le monoxyde d'azote contribue à la diminution de l'activité des enzymes du cytochrome P450 (Takemura et coll., 1999; Bakarat et coll., 2001; El-Kadi et coll., 1997). L'IL-6 augmente l'expression de la monoxyde synthase inductible (iNOS) et augmente les concentrations de monoxyde d'azote cellulaire (Kleinert et coll., 2004; Kourylko et coll., 2006). L'IL-1 β stimule la production de monoxyde d'azote dans des hépatocytes et augmente l'expression de l'iNOS dans les cardiocytes de rats (Kitade et coll., 1996; Tsujino et coll., 1994).

Les mécanismes régissant la diminution d'activité des enzymes du cytochrome P450 par le monoxyde d'azote ne sont pas complètement élucidés. En utilisant des rats recevant du lipopolysaccharide, Khatsenko et Kikkawa ont démontré que le monoxyde d'azote est un des médiateurs responsables de l'inhibition des CYP2C11, CYP3A2, CYP1A2 et CYP 2B1/2 (Khatsenko et Kikkawa, 1997). La baisse d'activité des enzymes du cytochrome P450 pourrait être due à la liaison du monoxyde d'azote au groupement prosthétique des enzymes du cytochrome P450 (Minamiyama et coll., 1997; Vuppugalla et Mehvar, 2004). D'autres laboratoires ont démontré que le peroxy-nitrite dérivé du monoxyde d'azote, inactive les isoformes du cytochrome P450 en se fixant à une tyrosine de l'enzyme (Lin et coll., 2003; Quaroni et coll., 2004; Turowski et coll., 2007). Cependant, dans notre laboratoire, nous avons démontré que l'inhibition du CYP3A6 par la réaction inflammatoire produite par la térébenthine n'implique pas une nitrotyrosilation (Kourylko et coll., 2006). Dans le modèle expérimental de la térébenthine, la diminution de l'activité des enzymes du cytochrome P450 par le monoxyde d'azote pourrait aussi être

produite par la diminution de l'activité de la NADPH-réductase par le monoxyde d'azote. En base de ces rapports, il était intéressant d'explorer l'effet du monoxyde d'azote sur l'activité de la NADPH-réductase.

Afin d'étudier l'effet du monoxyde d'azote sur l'activité de la NADPH-réductase, nous avons incubé des hépatocytes en présence de nitroprussiate de sodium, donneur de monoxyde d'azote, pendant 24 heures. Les métabolites produits par la dégradation du nitroprussiate de sodium sont le monoxyde d'azote, l'anion cyanure et le peroxyde d'hydrogène (Grossi et D'angelo, 2005; Rao et coll., 1991). Nos résultats confirment que le nitroprussiate de sodium diminue l'activité de la NADPH-réductase, ainsi que l'activité du CYP3A6.

Afin d'impliquer le monoxyde d'azote dans la réduction d'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6, il nous fallait vérifier si l'IL-1 β et l'IL-6 étaient capables d'induire la production de monoxyde d'azote dans les H_{CONT}. Nous avons observés que l'incubation d'IL-6 dans des H_{CONT} pendant 48 heures augmente la production de monoxyde d'azote; par contre, l'IL-1 β n'augmente pas la concentration de monoxyde d'azote. Ces résultats suggèrent que l'augmentation des concentrations de monoxyde d'azote par l'IL-6 pourrait contribuer à la diminution de l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6. Il est à noter que le test statistique pour la concentration de monoxyde d'azote en présence d'IL-1 β n'atteint pas une puissance assez élevée pour éliminer l'effet de cette cytokine sur la concentration de monoxyde d'azote dans les hépatocytes, effet possiblement via iNOS.

La réaction inflammatoire aseptique produite par la térébenthine augmente la production de formes radicalaires de l'oxygène dans le foie (Proulx et coll., 1995; Proulx et du Souich 1995; Galal et du Souich 1999). Par ailleurs, l'IL- β augmente la production intracellulaire de peroxyde d'hydrogène (Cao et coll., 2004; Guikema et coll., 2005; Li et Engelhardt 2006). Les études d'Archakov et coll. suggèrent que le peroxyde d'hydrogène formé par les enzymes du cytochrome P450 peut interagir avec le Fe²⁺ de l'hème des enzymes du cytochrome P450, provoquant la destruction du groupement hème et ainsi l'inactivation des enzymes (Karuzina et Archakov, 1994; Archakov et coll., 1998). De plus, l'exposition des microsomes de rats au peroxyde d'hydrogène diminue le métabolisme du benzo[a]pyrène en inhibant l'activité de la NADPH-réductase (Flowers et Miles, 1991).

Dans notre laboratoire, nous avons observé que le peroxyde d'hydrogène diminue l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6. Le peroxyde d'hydrogène diminue l'activité de la NADPH-réductase avec une puissance six fois plus élevée que l'activité du CYP3A6. Cette différence peut s'expliquer par le mécanisme de court-circuit du peroxyde d'hydrogène dans lequel les enzymes du cytochrome P450 peuvent conserver leur activité catalytique sans apport d'électrons de la NADPH-réductase (Otey et coll., 2004).

Notre laboratoire a déjà démontré que l'inhibition de la p38 MAPK par le SB203580 augmente l'activité du CYP3A6, sans influencer l'expression de la protéine après 24

heures d'incubation dans des hépatocytes de lapin (Kourylko et coll., 2006). L'augmentation d'activité du CYP3A6 par la présence de SB203580 pouvait s'expliquer par plusieurs mécanismes : 1) par l'inhibition de la p38 MAPK en supposant que cette kinase diminue l'activité de l'enzyme, 2) par l'accroissement de l'activité de la NADPH-réductase et 3) par un artéfact qui augmenterait la fluorescence de la sonde utilisée pour mesurer l'activité du CYP3A6.

Le SB203580 augmente la fluorescence associée à l'activité du CYP3A6, mais n'a aucun effet sur l'activité de la NADPH-réductase. L'activité apparente du CYP3A6 en présence de SB203580 est 2 fois plus élevée que l'activité de base du CYP3A6. L'incubation de SKF86002, inhibiteur de la p38 MAPK, avec des H_{CONT} ne modifie pas l'activité de base de la NADPH-réductase ni celle du CYP3A6. L'ensemble des expériences réalisées suggère que l'augmentation apparente de l'activité du CYP3A6 par le SB203580 serait due à un artéfact. L'augmentation de l'activité du CYP3A6 serait sensible à une incubation continue en présence de DPI (tableau 3 et 4) se qui implique que la fluorescence proviendrait de la dégradation du SB203580 par la NADPH-réductase, les CYP ou tout autre flavo-protéine inhibée par le DPI.

Lorsque l'on incube du DFB dans du tampon Krebs, la fluorescence de base est d'environ 600 unités arbitraires. Dans des H_{CONT}, la fluorescence de base moyenne du métabolite du DFB, le DFH, est de 4000. Or lorsque l'on incube du SB203580 sans DFB avec des hépatocytes, la fluorescence émise est de 25000, expliquant la hausse apparente d'activité du CYP3A6 notée par ce produit. Ces résultats suggèrent

que l'augmentation apparente de l'activité du CYP3A6 par le SB203580 est due à la fluorescence émise par le SB203580 ou à son/ses métabolite(s). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons incubés du SB203580 dans du tampon Krebs pendant 24 heures et nous avons mesurés la fluorescence émise en présence de 60 μ M de DFB. Dans ces conditions expérimentales le DFB et le SB203580 ne sont pas métabolisés et nous devrions mesurer que la fluorescence de base. Les résultats confirment que le SB203580 émet une fluorescence de base écartant l'hypothèse que la fluorescence est secondaire à un métabolite du SB203580. Néanmoins, ces expériences nous permettent de conclure que la p38 MAPK ne module pas l'activité de base de la NADPH-réductase.

L'incubation des H_{CONT} en présence d'IL-6 diminue l'activité de la NADPH-réductase d'environ 20%. En présence de SB203580, l'IL-6 diminue l'activité de la NADPH-réductase d'approximativement 20%. Des expériences semblables ont été répétées avec le SKF86002, un autre inhibiteur de la p38 MAPK, et démontrent que l'inhibition de la p38 MAPK n'empêche pas la réduction de l'activité de la NADPH-réductase par l'IL-6. Ces expériences nous permettent de conclure que l'inhibition de la NADPH-réductase par l'IL-6 n'est pas médiée par la p38 MAPK. En résumé, la p38 MAPK n'est pas responsable de l'augmentation de l'activité du CYP3A6 par le SB203580, ne module pas l'activité de base de la NADPH-réductase et n'est pas responsable de la diminution de l'activité de la NADPH-réductase par l'IL-6.

Afin de caractériser les voies de signalisations impliquées dans la diminution de l'activité de la NADPH-réductase par l'IL-6, nous avons utilisés la wortmannine et le LY294002 pour inhiber la PI₃K, le PD098059 pour inhiber les ERK1/2, le piceatannol pour inhiber la JAK1 kinase et le pyrrolidine dithiocarbamate pour inhiber l'activation du NF-κB. L'incubation de LY294002, de PD098059, de piceatannol ainsi que du pyrrolidine dithiocarbamate avec des hépatocytes diminue l'activité de base de la NADPH-réductase, suggérant que les voies de la PI₃K, des ERK1/2 et de JAK/STAT ainsi que le facteur de transcription NF-κB sont nécessaires à l'activité de base de la NADPH-réductase. Par ailleurs, nos résultats montrent que les voies de la PI₃K, des ERK1/2 et de JAK/STAT sont impliquées dans la diminution de l'activité de la NADPH-réductase produite par l'IL-6. D'un autre coté, le pyrrolidine dithiocarbamate incubé avec l'IL-6 produit un effet additif sur la diminution de l'activité de la NADPH-réductase. Nous observons aussi une diminution de l'activité de base du CYP3A6 (50%) lorsque l'on incube du pyrrolidine dithiocarbamate pendant 48 heures avec des hépatocytes (figure 41). Ces résultats confirment le rapport indiquant que dans des hépatocytes incubés avec du sérum de lapins présentant une réaction inflammatoire, la présence de pyrrolidine dithiocarbamate diminue l'activité du CYP3A6 (Kourylko et coll., 2006).

Le pyrrolidine dithiocarbamate est un thiol ayant des propriétés d'antioxydant et pro-oxydantes. Le pyrrolidine dithiocarbamate élimine le peroxyde d'hydrogène, désactive les formes radicalaires de l'oxygène (Mankhetkorn et coll., 1994), oxyde la glutathionne (Hosni et coll., 1992) et induit l'ARN messager de *l'hème-oxygénase*

I (Malaguarnera et coll., 2003). L'hème-oxygénase I est une protéine cytoprotectrice à rôle d'antioxydant qui a besoin d'électrons transférés par la NADPH-réductase pour son activité catalytique. En présence d'hème oxygénase I et d'enzyme du cytochrome P450, la NADPH-réductase cède les électrons préférentiellement à l'hème oxygénase I. L'association préférentielle de la NADPH-réductase à l'hème-oxygénase I inhibe compétitivement l'interaction de la NADPH-réductase avec les enzymes du cytochrome P450 et diminue ainsi la production d'anion superoxyde en provenance du cycle catalytique des enzymes du P450 (Emerson et Levine, 2000). Nos résultats pourraient être expliqués en tenant compte que le pyrrolidine dithiocarbamate induit l'hème oxygénase I qui recrute les électrons de la NADPH-réductase et ainsi inhibe « compétitivement » l'activité du CYP3A6. Il a été démontré que l'expression de l'hème oxygénase I est augmentée suite à la réaction inflammatoire produite par la térébenthine (Lyoumi et coll., 1998). Par ailleurs, il a été rapporté que lors de la réaction inflammatoire produite par l'injection de térébenthine, l'induction de l'hème oxygénase hépatique est médiée par l'IL-6 (Tron et coll., 2005). Ces rapports pourraient expliquer comment l'incubation simultanée de l'IL-6 et du pyrrolidine dithiocarbamate réduit de façon additive l'activité de la NADPH-réductase.

Le NF- κ B est un facteur de transcription qui augmente la transcription de nombreuses protéines pro-inflammatoires. L'inhibition de la transactivation du NF- κ B par le pyrrolidine dithiocarbamate n'apporte aucun changement de l'expression de la NADPH-réductase, excluant la possibilité que la diminution de l'activité de la

NADPH-réductase soit causée par un mécanisme pré-transcriptionnel par l'inhibition de la transactivation du NF- κ B.

Les expériences précédentes suggèrent que plusieurs kinases sont nécessaires à l'activité constitutive de la NADPH-réductase. Afin de mieux caractériser ces kinases/voies de signalisations qui modulent l'activité de la NADPH-réductase, nous avons utilisé l'acide okadaïque et la calyculine A, des inhibiteurs des protéines phosphatases sérine-thréonine, en absence et en présence d'inhibiteurs des kinases. L'inhibition des protéines phosphatases permet l'activation des protéines kinases et de leurs voies de signalisation. Par exemple, l'inhibition de la protéine phosphatase 2 (PP2) avec l'acide okadaïque entraîne la phosphorylation et l'activation de la p38 MAPK (Boudreau et coll., 2007).

L'incubation de la calyculine A pendant 24 heures diminue l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6. Cependant, après 48 heures d'incubation, l'acide okadaïque et la calyculine A diminuent l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6. Ces résultats suggèrent que l'activité constitutive de la NADPH-réductase et du CYP3A6 est diminuée par des phosphorylations normalement prévenues par des protéines phosphatases sérine-thréonine. L'acide okadaïque et la calyculine A sont des inhibiteurs de protéines phosphatases 1 et 2, des protéines phosphatases sérines/thréonines spécifiques. En plus de déphosphoryler les substrats des protéines kinases, les protéines phosphatases vont aussi réguler l'activité de certaines protéines kinases. *In vitro*, la protéine phosphatase 2 déphosphoryle la PKA, la PKC,

les ERK, la MEK, la MAPK et l' $\text{I}\kappa\text{B}$, c'est-à-dire que la protéine phosphatase 2 déphosphoryle et inactive ces kinases (Millward et coll., 1999). Par ailleurs, il a été démontré que la calyculine A et l'acide okadaïque diminuent l'activité basale et l'activité induite par le phénobarbital des CYP2A5, CYP2B10 et du CYP1A1/2 (Posti et coll., 1999), suggérant que la déphosphorylation des protéines kinases pourrait moduler l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6.

Nos données démontrent que l'acide okadaïque et la calyculine A diminuent l'activité de la NADPH-réductase d'environ 60%, après 48 heures d'incubation. Lorsque l'on inhibe la PKC, la PI_3K , les ERK 1/2 et la p38 MAPK en présence d'inhibiteur de protéines phosphatases, nous n'observons aucune augmentation d'activité de la NADPH-réductase, indiquant que ces voies de signalisations ne régulent pas l'activité de la NADPH-réductase.

L'acide okadaïque et la calyculine A inhibent l'activité du CYP3A6. L'activité constitutive du CYP3A6 est augmentée après l'inhibition de la PKC et de la PI_3K . Cependant, en présence de calyculine A, l'inhibition de la PKC et du PI_3K n'augmente pas l'activité du CYP3A6. Par ailleurs, l'inhibition des ERK 1/2 n'a aucun effet sur l'activité du CYP3A6 et ne change pas l'effet de la calyculine A sur l'activité du CYP3A6. Le pyrrolidine dithiocarbamate diminue l'activité basale du CYP3A6 et son effet s'additionne à la diminution de l'activité du CYP3A6 par la calyculine A. Ces résultats suggèrent que 1) la voie de la PKC et de la PI_3K agissent comme répresseur de l'activité de base du CYP3A6 2) la PKC, la PI_3K et les ERK

1/2 ne sont pas impliquées dans la régulation négative de l'activité du CYP3A6 en présence de calyculine A et 3) le pyrrolidine dithiocarbamate diminue l'activité constitutive du CYP3A6 soit par un mécanisme post-transcriptionnel, c'est-à-dire secondairement à la diminution de l'activité de la NADPH-réductase ou soit par les propriétés d'antioxydant du pyrrolidine dithiocarbamate.

La phosphorylation des résidus sérines du CYP2B1 et du CYP2B4 par la protéine kinase A purifiée interfère avec la liaison à la NADPH-réductase et empêche le transfert d'électrons, ce qui inhibe leurs activités; en plus, la phosphorylation de la sérine altère la conformation du CYP2B1 inhibant son activité catalytique (Oesch-Bartlomowicz et Oesch, 2002). Ces résultats soulèvent la possibilité qu'en inhibant les protéines phosphatase 1 et 2 par la calyculine A, l'activation des kinases mène à la phosphorylation de résidus sérines du CYP3A6 et de la NADPH-réductase entraînant une réduction de leur activité. Dans ce cas, la phosphorylation ne serait pas causée par les protéines sérine/thréonines kinases étudiées soit la PKC, les ERK 1/2, la PI₃K et la p38 MAPK, car leur inhibition n'empêche pas la diminution d'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6 par la calyculine A. La c-Jun N-terminale kinase (JNK) fait partie de la famille des MAPK, elle est activée par les formes radicalaires de l'oxygène, les cytokines pro-inflammatoires et par l'inhibition des protéines phosphatase sérine/thréonine (Shen et Liu 2006; Poulos et coll., 1997; Avdi et coll., 2002). Les résultats négatifs concernant la PKC, les ERK 1/2, la p38 MAPK et la PI₃K nous poussent à émettre l'hypothèse selon laquelle la JNK est

responsable de la diminution d'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6 lorsque les hépatocytes sont incubés avec l'acide okadaïque et la calyculine A.

Suite à l'incubation des H_{CONT} avec de la calyculine A pendant 48 heures, l'expression du CYP3A6 a doublée, démontrant que l'induction de l'expression du CYP3A6 implique des phosphorylations. Il est possible que la JNK soit responsable de l'augmentation d'expression du CYP3A6 par la calyculine A. Lorsqu'elle est activé, la JNK phosphoryle *c-jun* qui dimérisé a *c-fos* forme la protéine d'activation 1 (AP-1) (Lo et Cruz, 1995). L'inhibition des protéines phosphatases 1 et 2 par l'acide okadaïque et de la calyculine A augmente l'activité de JNK et augmente l'activité de liaison de l'AP-1 à l'ADN (Rosenberger et coll., 1999). L'AP-1 est un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes impliqués dans la réaction inflammatoire. Il a été démontré que durant l'hypoxie, l'AP-1 se fixe au promoteur du gène du CYP3A6 et induit son expression (Fradette et du Souich, 2003). Ces rapports suggèrent que l'augmentation de l'expression du CYP3A6 par la calyculine A pourrait être secondaire à l'activation de la JNK et de l'AP-1. De plus, nos résultats démontrent que l'inhibition de ERK 1/2 avec le PD098059 empêche l'induction du CYP3A6 par la calyculine A. Or, il a été démontré que l'augmentation de l'expression du CYP3A6 par l'hypoxie est prévenue par l'inhibition des ERK 1/2 (Fradette et du Souich 2003); de plus, il est connu que ERK 1/2 sont essentiels à l'augmentation de l'expression de l'AP-1 produite par l'inhibition des protéines phosphatases (Rosenberger et coll., 1999) et que comme JNK, les ERK 1/2 augmentent l'expression de AP-1 (Poulos et coll., 1997). En base

à ces rapports, l'hypothèse est que l'activation des ERK 1/2 serait impliquée dans la régulation positive de l'expression du CYP3A6 et serait nécessaire à l'induction de l'expression du CYP3A6 par la calyculine A.

Contrairement à l'expression du CYP3A6, l'expression de la NADPH-réductase n'est pas modifiée après 24 et 48 heures d'incubation avec les inhibiteurs de protéines phosphatases, suggérant que la réduction de l'activité du CYP3A6 par la calyculine A est possiblement secondaire à des changements post-transcriptionnels, c'est-à-dire un ralentissement du cycle catalytique provoqué par la diminution de l'activité de la NADPH-réductase.

Le SB203580 augmente l'expression du CYP3A6 et l'expression est de 1,5 fois plus élevée lorsque l'on combine la calyculine A au SB203580. La p38 MAPK exerce un rôle répressif de l'induction des gènes des enzymes de phase II ARE-dépendant (antioxydant responsive element-dependant) (Yu et coll., 2000). Il a été démontré que l'inhibition des protéines phosphatases par la calyculine A active et phosphoryle la p38 MAPK (Chen et coll., 2000b; Birkenkamp et coll., 2000) impliquant que l'activation simultanée de la JNK et de la p38 MAPK par la calyculine A provoque une augmentation d'expression du CYP3A6, mais que de base, la p38 MAPK pourrait être impliquée dans la répression de l'expression du CYP3A6.

F. Conclusion

Cette étude nous permet d'atteindre un certain nombre de conclusions. Premièrement, *in vivo*, la réaction inflammatoire provoquée par l'injection de térébenthine diminue l'activité de la NADPH-réductase de même que l'activité du CYP3A6. En plus de diminuer l'activité de la NADPH-réductase, la réaction inflammatoire diminue l'expression et la quantité d'ARN messager de la NADPH-réductase. Nous pouvons spéculer que la diminution de 60% de l'activité du CYP3A6 lors de la réaction inflammatoire est en partie secondaire à la réduction de l'activité de la NADPH-réductase et en partie causée par la diminution de l'expression du CYP3A6.

Deuxièmement, nos résultats démontrent que, *in vitro*, les cytokines pro-inflammatoires, l'IL-6 et l'IL-1 β , mais pas l'IFN- γ ni le TNF- α , diminuent l'activité et l'expression de la NADPH-réductase. Les deux cytokines, l'IL-6 et l'IL-1 β , diminuent l'activité et l'expression du CYP3A6. La diminution de l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6 par l'IL-6 et l'IL-1 β est secondaire à un mécanisme pré-transcriptionnel, c'est-à-dire que la diminution de l'activité de la NADPH-réductase est provoquée par la diminution de l'expression de la protéine. De plus, la diminution de l'activité du CYP3A6 par l'IL-6 et l'IL-1 β doit en partie être secondaire à la diminution de l'activité de la NADPH-réductase.

Outre les cytokines, les radicaux libres influencent l'activité de la NADPH-réductase. Le monoxyde d'azote et le peroxyde d'hydrogène diminuent l'activité de la NADPH-réductase et l'activité du CYP3A6. La diminution de l'activité de la

NADPH-réductase par le monoxyde d'azote est comparable à la diminution de l'activité du CYP3A6. Cependant, le peroxyde d'hydrogène a un effet inhibiteur plus puissant sur l'activité de la NADPH-réductase que sur l'activité du CYP3A6.

L'inhibition de la voie de la p38 MAPK par le SB203580 et le SKF86002 n'influence pas l'activité de base de la NADPH-réductase. La voie de la p38 MAPK n'est pas impliquée dans la diminution de l'activité de la NADPH-réductase par l'IL-6. L'augmentation apparente de l'activité du CYP3A6 par le SB203580 est causée par un artéfact lors de la lecture de l'activité du CYP3A6. Le SKF86002 n'augmente pas l'activité de base du CYP3A6, ce qui nous permet de conclure que la voie de la p38 MAPK n'est pas impliquée dans la modulation de l'activité de la NADPH-réductase et du CYP3A6.

Nos études nous informent sur les voies de signalisations impliquées dans la régulation de l'activité et l'expression de la NADPH-réductase. L'activité des voies de la PI₃K, des ERK1/2 et de la JAK/STAT est nécessaire au maintien de l'activité de base de la NADPH-réductase. Aucune de ces voies n'est impliquée dans la diminution de l'activité de la NADPH-réductase par l'IL-6. Par ailleurs, nous avons démontré que le pyrrolidine dithiocarbamate diminue l'activité de la NADPH-réductase probablement en induisant l'hème oxygénase I. À ce stade, il n'est pas possible d'exclure que le pyrrolidine dithiocarbamate diminue l'activité de la NADPH-réductase par la diminution du transfert d'électrons grâce à ses propriétés d'antioxydant.

L'activité du CYP3A6 a augmenté par l'inhibition de la PKC et de la PI₃K. D'un autre coté, les activités de la NADPH-réductase et du CYP3A6 sont diminuées par la calyculine A et cette diminution n'est pas affecté par l'inhibition de la PKC, du PI₃K, des ERK 1/2 et du NF-κB suggérant que l'inhibition des protéines phosphatases 1 et 2 par la calyculine A active d'autre sérine/thréonine kinase, comme par exemple la JNK. L'augmentation de l'expression du CYP3A6 par la calyculine A pourrait être provoquée par l'activation de JNK et de l'AP-1. L'effet de la calyculine A sur l'expression du CYP3A6 est inhibé par le PD098059, inhibiteur de la ERK 1/2, suggérant que la voie des ERK 1/2 serait nécessaire à l'augmentation de l'expression du CYP3A6 par la calyculine A. L'inhibition de la p38 MAPK par le SB203580 augmente l'expression du CYP3A6 et cet effet s'additionne à l'augmentation d'expression du CYP3A6 par la calyculine A, suggérant que la p38 MAPK pourrait agir comme suppresseur du gène du CYP3A6.

Finalement, les études réalisées mettent en évidence le parallélisme entre les changements de l'activité de la NADPH-réductase et les modifications de l'activité du CYP3A6. Que se soit par la réaction inflammatoire ou par l'incubation avec des cytokines, avec du monoxyde d'azote, avec du peroxyde d'hydrogène ou par l'inhibition des protéines phosphatases et par l'inhibition de l'activation du NF-κB, toutes ces expériences ont diminué l'activité de la NADPH-réductase et entraîné une diminution de l'activité du CYP3A6, souvent en absence de changement de l'expression de la protéine.

G. Bibliographie

Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, Beaune P et Guillouzo A. **Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture.** *Mol Pharmacol.* (1993) 44(4):707-15.

Abdel-Razzak Z, Corcos L, Fautrel A et Guillouzo A. **Interleukin-1 beta antagonizes phenobarbital induction of several major cytochromes P450 in adult rat hepatocytes in primary culture.** *FEBS Lett.* (1995) 12;366(2-3):159-64

Ando Y., Fuse E., et Figg W.D. **Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily.** *Clin Cancer Res.*, (2002) 8:1964-1973

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

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT et Saltiel AR **“PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo”** *J. Biol. Chem.* (1995) 270(46):27489-94

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

Assenat E, Gerbal-Chaloin S, Larrey D, Saric J, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ et Pascussi JM., **Interleukin 1beta inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance.,** *Hepatology.* (2004) 40(4):951-60.

Avdi NJ, Malcolm KC, Nick JA, Worthen GS. **A role for protein phosphatase-2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in human neutrophils.** *J Biol Chem.* (2002) 277(43):40687-96

Backes W. L. **NADPH-cytochrome P450 reductase function,** Dans: *Cytochrome P450*, Shenkman J. B. et Greim H. ed., 1993, pp. 15-34. Springer-Verlag, Berlin.

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

Bakarat MM, El-Kadi AO et du Souich P. **L-NAME prevents in vivo the inactivation but not the down-regulation of hepatic cytochrome P450 caused by an acute inflammatory reaction.** *Life Sci.* (2001)17;69(13):1559-71

Barker CW, Fagan JB et Pasco DS **Down-regulation of P450 1A1 and P450 1A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress.** *J Biol Chem* (1994) 269: 3985-3990

Barouki R. et Morel Y. **Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications,** *Biochemical Pharmacology* (2001)61(15): 511-516

Barry M. Forman, Iphigenia Tzamelis, Hueng-Sik Choi, Jasmine Chen, Devendranath Simha, Wongi Seol, Ronald M. Evans et David D. Moore, **Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR- β ,** *Nature* (1998) 395: 612-615

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

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

Birkenkamp KU, Tuyt LM, Lummen C, Wierenga AT, Kruijer W et Vellenga E. **The p38 MAP kinase inhibitor SB203580 enhances nuclear factor-kappa B transcriptional activity by a non-specific effect upon the ERK pathway.** *Br J Pharmacol.* (2000) 131(1): 99-107

Bleau AM, Maurel P, Pichette V, Leblond F et du Souich P. **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.* (2003) 473(2-3): 197-206

Bleau AM, Levitchi MC, Maurice H et du Souich P. **Cytochrome P450 inactivation by serum from humans with a viral infection and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammation: the role of cytokines,** *Br J Pharmacol.* (2000) 130(8): 1777-84

Bodin K, Andersson U, Rystedt E, Ellis E, Norlin M, Pikuleva I, Eggertsen G, Bjorkhem I, et Diczfalusy U **Metabolism of 4 beta-hydroxycholesterol in humans.** *J Biol Chem* (2002) 277: 31534 –31540

Boudreau RT, Conrad DM et Hoskin DW. **Apoptosis induced by protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition in T leukemia cells is negatively regulated by PP2A-associated p38 mitogen-activated protein kinase.** *Cell Signal.* (2007) 19(1): 139-51

Boulton T.G., Zhong Z., Wen Z., Darnell J., Stahl N. et Yancopoulos G.D. **STAT3 Activation by Cytokines Utilizing gp130 and Related Transducers Involves a**

Secondary Modification Requiring an H7-Sensitive Kinase *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92: 6915–6919

Calbiochem, <http://www.emdbiosciences.com>, products catalog number 203297

Cao W, Vrees MD, Potenti FM, Harnett KM, Fiocchi C et Pricolo VE. **Interleukin 1beta-induced production of H₂O₂ contributes to reduced sigmoid colonic circular smooth muscle contractility in ulcerative colitis.** *J Pharmacol Exp Ther.* (2004) 311(1): 60-70

Carlson TJ et Billings RE. **Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450.** *Mol Pharmacol* (1996) 796-801

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

Chang G. W. M. et Kam P. C. A. **Cytochrome P450 isoenzymes.** *Anaesthesia* (1999) 54 : 42–50

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

Chen H., Fantel A.G., et Juchau M.R. **Catalysis of the 4-hydroxylation of retinoic acids by CYP3A7 in human fetal hepatic tissues.** *Drug Metab. Dispos.* (2000a) 25: 1051-1057

Chen KD, Lai MT, Cho JH, Chen LY et Lai YK. **Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and mitochondrial Ca(2+)-mediated oxidative stress are essential for the enhanced expression of grp78 induced by the protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A.** *J Cell Biochem.* (2000b) 76(4): 585-95

Chiba K., Kobayashi K., Manabe K., Tani M., Katamaki T., et Ishizaki T. **Oxidative metabolism of omeprazole in human liver microsomes: cosegregation with S-mephenytoin 4'-hydroxylation.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1993) 266: 52-59

Chie-Chen Hong et al. **Cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) Activity and Risk Factors for Breast Cancer: A Cross-Sectional Study,** *Breast Cancer Res* (2004) 6(4):352-365

Cooper G.M. **Cell Signaling**, Dans: *The Cell a molecular approach*, deuxième édition, (2000) édition web

Cooper G.M. et Hausman R.E., **Cell Signaling**, Dans: *The Cell a molecular approach*, troisième édition, (2004) 541-589

Correia M.A., de Mortellano P.R.O. **Inhibition of cytochrome P450 enzymes. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry**, troisième édition, (2005) 247-322

Dai, D., Zeldin D.C., Blaisdell J.A., Chanas B., Coulter S.J., Ghanayem B.I., et al, **Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. Pharmacogenetics** (2001) 6: 1-42

De Montenallo O.P.R., et Mico B.A., **Destruction of cytochrome P-450 by ethylene and other olefins. Mol. Pharmacol.** (1980) 18: 128-135

de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP et Beaune PH. **Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. J Pharmacol Exp Ther.** (1990) 253(1): 387-94

Deckers C.J., Rashed M.S., Bailie T.A., Maltby D. et Correia M.A., **Oxidative metabolism of sironolactone : Evidence for the involvement of electrophilic thisteroid species in drug-mediated destruction of rat hepatic cytochrome P450. Biochemistry** (1989) 28: 5128-5136

Denison M.S., Fisher J.M. et Whitlock J.P, **The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. J. Biol Chem.** (1988) 263: 17221-17224

Desvergne B et Wahli W. **Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr. Rev.** (1999) 20: 649– 88

Ding X, et Staudinger JL, **Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C, Biochem Pharmacol.** (2005) 1;69(5):867-73

El-Kadi A.O.S., Bleau AM, Dumont I, Maurice H, et du Souich P. **Role of Reactive Oxygen Intermediates in the Decrease of Hepatic Cytochrome P450 Activity by Serum of Humans and Rabbits with an Acute Inflammatory Reaction, Drug. Metab. Dispo.,** (2000) 28(9): 1112-1120

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

Emerson M. R. et LeVine S. M. **Heme Oxygenase-1 and NADPH Cytochrome P450 Reductase Expression in experimental Allergic Encephalomyelitis: An**

Expanded View of the Stress Response. *Journal of Neurochemistry* (2000) 75: 2555–2562

Estabrook R. W., Cooper D. Y., et Rosenthal O., **The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid c21-hydroxylase system in the adrenal cortex.** *Biochemische Zeitschrift*, (1963) 338:741-55

Estabrook, R.W., Franklin, M.R., Cohen, B., Shigamatzu, A. et Hildebrandt, A.G., **Biochemical and genetic factors influencing drug metabolism. Influence of hepatic microsomal mixed function oxidation reactions on cellular metabolic control.** *Metabolism* (1971)20 :187–199

Fan, L.Q., Coley, J, Miller RT, Cattley RC et Corton JC. **Opposing mechanisms of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase regulation by peroxisome proliferator.** *Biochem Pharmacol.* (2003) 65 (267): 3294-3301

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

Feingold K, Kim MS, Shigenaga J, Moser A et Grunfeld C. **Altered expression of nuclear hormone receptors and coactivators in mouse heart during the acute-phase response.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2004) 286(2):E201-7

Ferrandi C, Ardisson V, Ferro P, Ruckle T, Zaratin P, Ammannati E, Hauben E, Rommel C et Cirillo R. **PI3K $\{\gamma\}$ inhibition plays a crucial role in early steps of inflammation by blocking neutrophil recruitment** *J Pharmacol Exp Ther.* (2007) 322(3): 923-30.

Flowers NL et Miles PR., **Alterations of pulmonary benzo[a]pyrene metabolism by reactive oxygen metabolites.** *Toxicology.* (1991) 68(3): 259-74

Fradette C, du Souich P. **Hypoxia-inducible factor-1 and activator protein-1 modulate the upregulation of CYP3A6 induced by hypoxia.** *Br J Pharmacol.* (2003)140(6):1146-54

Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP et Lund EG **27-Hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells.** *J Biol Chem* (2001) 276: 38378 –38387

Fujii H., Ichimori K, Hoshiai K. et Nakazawa H. **Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process.** *J. Biol. Chem.* (1997) 272: 32773–32778

Fujisawa-Sehara A., Sogawa K., Yamane M. et Fujii-Kuriyama Y. **Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-**

metabolizing cytochrome P-450c gene : A similary to glucocorticoid regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* (1987) 15: 4179-4191

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

Gan L.-S., Acebo A.L. et Alworth W.L., **1-Ethylpyrene, a suicide inhibitor of cytochrome P-450 dependant benzo(a)pyrene hydroxylase activity in liver microsomes.** *Biochemistry.* (1984) 23: 3827-3836.

Ganapathi M.K. **Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, inhibits induction of acute-phase proteins by interleukin-6 alone or in combination with interleukin-1 in human hepatoma cell lines.** *Biochem. J.* (1992) 284: 645-648

Garfinkel D. **Studies on pig liver microsomes. Enzymes and pigment composition of different microsomal fractions.** *Arch.Biochem.Biophys.* (1958) 77: 493-509

Geller D, Nussler AK, DiSilvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL et Billiar TR, **Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthases in hepatocytes.** *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90: 522-526

Gottlicher M, Widmark E, Li Q et Gustafsson JA. **Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89: 4653- 57

Goldsby Richard A., Kindt Thomas J et Osborne Barbara A., **Migration des leucocytes et inflammation.** *Immunologie le cours de Janys Kuby* (2001): 371-393

Gonzalez FJ et Kasper CB. **Phenobarbital induction of NADPH-cytochrome c (P-450) oxidoreductase messenger ribonucleic acid.** *Biochemistry* (1980) 19(9): 1790-6

Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP et Meyer UA. **Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism.** *Nature.* (1988)4;331(6155): 442-6

Gordon S. **Development and Distribution of mononuclear Phagocytes : Relevance to Inflammation.** Dans: *INFLAMMATION Basic and Principles Clinical Correlates*, Gallin John I, Snyderman Ralph, ed., troisième édition, (1999): 35-59

Gray J.D, Renton K. W. et Hung O. R., **Depression of Theophylline Elimination. Following BCG Vaccination.** *Br. J. Clin. Pharmacol.*, (1983) 16: 735

Griner E.M. et Kazanietz M.G. **Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer**, *Nature Reviews Cancer* (2007)7: 281-294

Grossi L et D'angelo S., **Sodium Nitroprusside: Mechanism of NO Release Mediated by Sulfhydryl-Containing Molecules**. *J. Med. Chem.* (2005) 48: 2622-2626

Gu X., Ke S., Liu D. , Sheng T., Thomas P.E., Rabson A.B., Gallo M.A., Xie W., et Tian Y., **Role of NF- κ B in Regulation of PXR-mediated Gene Expression A MECHANISM FOR THE SUPPRESSION OF CYTOCHROME P-450 3A4 BY PROINFLAMMATORY AGENTS**, *J. Biol. Chem.*, (2006)281(26): 17882-17889

Guengerich FP. **Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity**. *AAPS Journal*. (2006) 8(1): E101-E111

Guengerich FP. **Human cytochrome P450 enzymes**, Dans: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, edition d'Ortiz de Montellano, (2005): 377-530

Guengerich, FP. **CYTOCHROME P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism**. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (1999)39: 1-17

Guengerich FP, Kim DH et Iwasaki M. **Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects**. *Chem Res Toxicol.* (1991) 4(2): 168-79

Guikema BJ, Ginnan R, Singer HA et Jourd'heuil D **Catalase potentiates interleukin-1beta-induced expression of nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells**. *Free Radic Biol Med.* (2005) 38(5): 597-605

Guzelian P.S et Swisher R.W., **Degradation of cytochrome P-450 haem by carbon tetrachloride and 2-allyl-2-isopropylacetamide in rat liver in vivo and in vitro : Involvement of non-carbon monoxide-forming mechanisms**. *Biochem Biophys.*, (1979)194: 481-489

Halpert J. et Neal R.A., **Inactivation of purified rat liver cytochrome P-450 by chloramphenicol**. *Mol. Pharmacol.* (1980) 17: 427-434

Hayaishi O., Proc. Plen. Session, 6th Int.Cong.Biochem. New York, (1964):31

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G. et Schaper F **Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation**. *Biochem J* (2003) 374: 1-20

Helvig C., Alayrac C., Miosjowski C., Koop D., Poullain D., Durst F., et al, **Suicide inactivation of cytochrome P450 by midchain and terminal acetylene. A mechanistic study of inactivation of a plant lauric acid omega-hydroxylase.** *J. Biol. Chem.*, (1997) 272: 414-421

Henderson CJ, Otto DM, Carrie D, Magnuson MA, McLaren AW, Rosewell I, Wolf CR. **Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase.** *J Biol Chem.* (2003)278(15): 13480-6

Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., Thierfelder, W. E., Kreider, B. et Silvennoinen, O. **Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs.** *Trends Biochem. Sci.* (1994)19: 222-227

Iber H, Chen Q., Cheng PY., Morgan ET., **Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukine-1 mediated by NF-kappaB binding at the transcription start site.** *Arch Biochem Biophys.* (2000)377(1):187-194. Erratum in *Arch Biochem Biophys* (2001)388(1)178

Ikegwuonu F.I., Christou M. et Jefcoate C.R., **Regulation of cytochrome P4501B1 (CYP1B1) in mouse embryo fibroblast (C3H10T1/2) cells by protein kinase C (PKC).** *Biochem. Pharmacol* (1999)57 : 619–630

Iyanagi T, Anan FK, Imai Y et Mason HS. **Studies on the microsomal mixed function oxidase system: redox properties of detergent-solubilized NADPH-cytochrome P-450 reductase.** *Biochemistry.* (1978)17(11): 2224-30

Ishihara H, Martin BL et al., **Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity.** *Biochem Biophys Res Commun.* (1989)159(3):871-7

Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR et Mangelsdorf DJ **An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha.** *Nature (Lond)* (1996)383: 728 –731.

Javitt NB. **Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways,** *The FASEB Journal* (1994) 8: 1308-1311

Joannard F, Rissel M, Gilot D, Anderson A, Orfila-Lefevre L, Guillouzo A, Atfi A et Lagadic-Gossmann D. **Role for mitogen-activated protein kinases in phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 2B in primary cultures of rat hepatocytes.** *Toxicol Lett.* (2006)161(1): 61-72

Jones P.B., Durrin L.K., Galeazzi D.R., et Whitlock J.P. Jr., **Control of cytochrome P1-450 gene expression : Analysis of a dioxin-responsive enhancer system.** *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* (1986)83: 2802-2806

Joannard F., Galisteo M., Corcos L., Guillouzo A. et Lagadic-Gossmann D., **Regulation of phenobarbital-induction of CYP2B and CYP3A genes in rat cultured hepatocytes: involvement of several serine/threonine protein kinases and phosphatases.** *Cell Biol Toxicol* (2000)16: 325–337.

Jover R, Bort R, Gómez-Lechón MJ et Castell JV. **Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved.** *FASEB J.* (2002)16(13): 1799-801

Karuzina IL et Archakov AI. **Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P450 during monooxygenase reactions.** *Free Radic Biol Med* (1996) 17: 557-567

Katzung Bertram G, *Basic & Clinical Pharmacology*, neuvième édition (2004)

Kawamoto T., Sueyoshi T., Zelko I., Moore R., Washburn K. et Negishi M., **Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in introduction of the CYP2B gene.** *Mol. Cell. Biol.* (1999)19: 6318-6322

Khatsenko O et Kikkawa Y. **Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver.** *J Pharmacol Exp Ther.* (1997)280(3):1463-70

Kirchheiner Julia et Brockmüller Jürgen, **Clinical Consequences of Cytochrome P450 2C9 Polymorphisms,** *Clinical Pharmacology & Therapeutics* (2005) 77: 1–16

Kitada M., Katamari T., Itahashi K., Rikihisa T., et Kanakubo Y., **Significance of cytochrome P-450 (P-450 HFLa) of human fetal liver in steroids and drugs oxidations.** *Biochem. Pharmacol.* (1987a)36: 456-456

Kitada M., Katamari T., Itahashi K., Rikihisa T., et Kanakubo Y., **P-450 HFLa, a form of cytochrome P-450 purified from human fetal liver, is the 16 α -hydroxylase of dehydroepiandrosterone 3-sulfate.** *J. Biol. Chem.* (1987b)262: 13534-13537

Kitade H, Sakitani K, Inoue K, Masu Y, Kawada N, Hiramatsu Y, Kamiyama Y, Okumura T et Ito S. **Interleukin 1 beta markedly stimulates nitric oxide formation in the absence of other cytokines or lipopolysaccharide in primary cultured rat hepatocytes but not in Kupffer cells.** *Hepatology.* (1996)23(4):797-802.

Klebanoff S.J. **Oxygen Metabolites from Phagocytes.** Dans: *INFLAMMATION Basic and Principles Clinical Correlates*, Gallin John I, Snyderman Ralph, éditeurs, troisième édition, (1999): 721-768

Kletzien RF, Clarke SD et Ulrich RG. **Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent.** *Mol. Pharmacol.* (1992)41: 393– 98

Klingenberg M., **Pigments of rat liver microsomes.** *Arch.Biochem.Biophys.* (1958)75:376

Klinger MH. **Platelets and inflammation.** *Anat Embryol (Berl).* (1997)196(1): 1-11.

Kliwer Steve A, Goodwin B et Willson T.M. **The Nuclear Pregnane X Receptor : A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism,** *Endocrine review* (2002)23(5): 687-702

Kleinert H, Pautz A, Linker K, et Schwarz PM **Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase.** *Eur J Pharmacol* (2004) 500: 255–266

Kobusch AB, Erill S et du Souich P. **Relationship between changes in seromuroid concentrations and the rate of oxidation or acetylation of several substrates.** *Drug Metab Dispos.* (1986)14(6):663-667

Kohno M. et Pouyssegur J., **Pharmacological inhibitors of the ERK signaling pathway: application as anticancer drugs** *Progress in Cell Cycle Research,* (2003)5: 219-224

Kourylko O, Fradette C, Arcand M et du Souich P. **Modulation of CYP1A2 and CYP3A6 catalytic activities by serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction and interleukin 6,** *Drug Metab Dispos.* (2006)34(1):27-35

Krens SF, Spaink HP et Snaar-Jagalska BE **Functions of the MAPK family in vertebrate-development** *FEBS Letters* (2006)580(21): 4984-90

Kurdi J., Maurice H, El-Kadi AO, Ong H, Dalkara S, Bélanger PM et Souich P. **Effect of hypoxia alone or combined with inflammation and 3-methylcholanthrene on hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits.** *Br J Pharmacol.* (1999) 128(2):365-73

Kushner I, et Rzewnicki, **Acute phase Response.** Dans: *INFLAMMATION Basic and Principles Clinical Correlates*, Gallin John I, Snyderman Ralph, éditeurs, troisième édition, (1999): 317-329

Lahti A, Kankaanranta H et Moilanen E. **P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 has a bi-directional effect on iNOS expression and NO production.** *Eur. J. Pharmacol.* (2002) 454(2-3):115-23

Lee YJ, Heo JS, Suh HN, Lee MY et Han HJ., **Interleukin-6 stimulates {alpha}-MG uptake in renal proximal tubule cells: involvement of STAT3, PI3K/Akt, MAPKs, and NF- κ B** *Am J Physiol Renal Physiol.* (2007)293(4):F1036-46

Levitchi M, Fradette C, Bleau AM, Michaud D, Kourylko O, Arcand M, et du Souich P., **Signal transduction pathways implicated in the decrease in CYP1A1, 1A2 and 3A6 activity produced by serum from rabbits and humans with an inflammatory reaction.** *Biochem Pharmacol* (2004)68: 573–582

Li Q et Engelhardt JF. **Interleukin-1beta induction of NFkappaB is partially regulated by H2O2-mediated activation of NFkappaB-inducing kinase.** *J Biol Chem.* (2006)281(3):1495-505

Lin HL, Kent UM, Zhang H, Waskell L, Hollenberg PF. **Mutation of tyrosine 190 to alanine eliminates the inactivation of cytochrome P450 2B1 by peroxyxynitrite** *Chem Res Toxicol.* (2003)16(2):129-36.

Lo, Y. Y. C., et Cruz, T. F. **Involvement of Reactive Oxygen Species in Cytokine and Growth Factor Induction of c-fos Expression in Chondrocytes** *J. Biol. Chem.* (1995) 270, 11727-11730

Lowry S.F., **Cytokine mediators of immunity and inflammation.** *Arch Surg.* (1993)128(11):1235-41

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

Lund EG, Guileyardo JM, et Russell DW **cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain.** *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96:7238 –7243

Lyoumi S., Puy H, Tamion F, Scotté M, Daveau M, Nordmann Y, Lebreton JP, Deybach JC. **Nitric oxide synthase inhibition and the induction of cytochrome P-450 affect heme oxygenase-1 messenger RNA expression after partial hepatectomy and acute inflammation in rats.** *Crit Care Med.* (1998)26(10):1683-1689

Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R et Smith RL. **Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man.** *Lancet.* (1977)2(8038):584-6

Malaguarnera L, Quan S, Pilastro M R, Abraham M G., et Kappas A., **Diminished Heme Oxygenase Potentiates Cell Death: Pyrrolidinedithiocarbamate Mediates Oxidative Stress.** *Experimental Biology and Medicine* (2003) 228:459-465

Mankhetkorn S, Abedinzadeh Z et Houee-Levin C. **Antioxidant action of sodium diethyldithiocarbamate: reaction with hydrogen peroxide and superoxide radical.** *Free Radic Biol Med.* (1994)7(6):517-27

Mannering G.J., et Deloria L.B., **The pharmacology and toxicology of the interferons: an overview,** *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1986)26: 455-515

Mason, H.S. **Mechanisms of oxygen metabolism.** *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* (1957)19:79-233

Masters, B.S.S, Williams, C.H. et Kamin H. **The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver.** *Methods in Enzymology,* (1967)10: 565-573

Miller G. E., Zemaitis M.A. et Greene F.E., **Mechanisms of diethyldithiocarbamate-induced loss of cytochrome P-450 from rat liver.** *Biochem Pharmacol.* (1983)32: 2433-2442.

Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. **Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A.** *Trends Biochem Sci.* (1999)24(5): 186-91

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

Morgan ET **Régulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how?** *Drug Metab Dispos* (2001)29(6):932.

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

Morgan ET, Thomas KB, Swanson R, Vales T, Hwang J et Wright K **Selective suppression of cytochrome P450 gene expression by interleukins 1 and 6 in rat liver.** *Biochim Biophys Acta* (1994)1219: 475-483

Morgan ET **Suppression of constitutive cytochrome P-450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxin.** *Mol Pharmacol.* (1989)36(5): 699-707

Myant NB and Mitropoulos KA. **Cholestérol 7 α -hydroxylase.** *J Lipid Res* (1977) 18: 135 –153

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

Nilsson G., Costa J.J. et Metcalfe D.D. **Mast Cells and Basophils** Dans: *INFLAMMATION Basic and Principles Clinical Correlates*, Gallin John I, Snyderman Ralph, éditeurs, troisième édition (1999): 97-117

Oesch-Bartlomowicz B et Oesch F. **Fast Regulation of Cytochrome P450 Activities by Phosphorylation and consequences for Drug Metabolism and Toxicity**, *Biol. Chem.* (2002)383: 1587 – 1592

Omura, et Sato R. **THE CARBON MONOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE.**, *Biol.Chem.* (1964)239: 2370

Otey CR, Silberg JJ, Voigt CA, Endelman JB, Bandara G et Arnold FH. **Functional evolution and structural conservation in chimeric cytochromes p450: calibrating a structure-guided approach.** *Chem Biol.* (2004)11(3):309-18

Otto D.M., Henderson C.J., Carrie D., Davey M., Gundersen T.E., Blomhoff R., Adams R.H, Tickle C. et Wolf C.R **Identification of novel roles of the cytochrome p450 system in early embryogenesis: effects on vasculogenesis and retinoic acid homeostasis**, *Mol. Cell. Biol.* (2003)23: 6103–6116

Paine M.J.I., Scrutton N.S., Munro A.W., Cutierrez A., Roberts G.C.K., et Wolf R.C. **Electron Transfer Partners of Cytochrome P450** Dans: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Ortiz de Montellano éditeur, (2005):115-148

Parasrampurda DA, de Boer P, Desai-Krieger D, Chow AT, et Jones CR **Single-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of RWJ 67657, a specific p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor: a first-in-human study.** *J Clin Pharmacol* (2003) 43: 406–413

Parent C., Bélanger P.M, Justras L. et P. du Souich, **Effect of inflammation on the rabbit hepatic cytochrome P-450 isoenzymes: alterations in the kinetics and dynamics of tolbutamide** *Journal of pharmacol. Exp. Ther.* (1992)261: 780

Parkinson A., **Casarett and Doull's Toxicology**, cinquième édition, (1995)

Pascusi JM., Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre JM, Maurel P et Vilarem MJ., **Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes.** *Biochem Biophys Res Commun.* (2000)274(3):707-13.

Pianezza, M. L., Sellers, E. M. et Tyndale, R. F. **Nicotine metabolism defect reduces smoking.** *Nature* (1998)393: 750

Pikuleva Irina A., **Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis**, *Pharmacology & Therapeutics* (2006)112(3): 761-773

Pilotto A, Seripa D, Franceschi M, Scarcelli C, Colaizzo D, Grandone E, Niro V, Andriulli A, Leandro G, di Mario F and Dallapiccola B, **Genetic Susceptibility to Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Related Gastroduodenal Bleeding: Role of Cytochrome P450 2C9 Polymorphisms** *Gastroenterology* (2007)133(2): 465-471

Poland A. Et Knutson J.C., **2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : Examination of the mechanism of toxicity**. *Annu. Rev. Oharmacol. Toxicol* (1982)22: 517-554

Posti K, Leinonen S, Tetri S, Kottari S, Viitala P, Pelkonen O et Raunio H. **Modulation of murine phenobarbital-inducible CYP2A5, CYP2B10 and CYP1A enzymes by inhibitors of protein kinases and phosphatases**. *Eur J Biochem.* (1999)264(1):19-26

Poulos JE, Weber JD, Bellezzo JM, Di Bisceglie AM, Britton RS, Bacon BR et Baldassare JJ. **Fibronectin and cytokines increase JNK, ERK, AP-1 activity, and transin gene expression in rat hepatic stellate cells**. *Am J Physiol.* (1997)273(4 Pt 1):G804-11

Powis G., Bonjouklian R, Berggren M.M, Abraham A. G. R, Ashendel C, Zalkow L, Matter W.F., Dodge J, Grindey G et Vlahos C. J., **Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses** *Biochem J.* (1993)296 (Pt 2):297-301

Prandota J. **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**, *American Journal of Therapeutics* (2005)12: 254-261

Proulx M et du Souich P. **Acute moderate hypoxia in conscious rabbits: effect on hepatic cytochrome P450 and on reactive oxygen species**. *J Pharm Pharmacol.* (1995)47(5):392-7

Proulx M, Maupoil V, Rochette L et du Souich P. **Increase in antilipoperoxidant activity of plasma as a consequence of an inflammatory reaction induced by subcutaneous turpentine in the rabbit**. *Free Radic Res.* (1995)23(3):245-54

Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, Verhagen A, Rivera CR, Mulvihill SJ, Malloy MJ, et al. **Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype**. *J Clin Investig* (2002) 110:109 –117

Pyerin W., Horn F. et Anigushi H. **Posttranslational modifications of the cytochrome P-450 monooxygenase system.** *J Cancer Res Clin Oncol.* (1987)113(2):155-9

Quaroni LG, Seward HE, McLean KJ, Girvan HM, Ost TW, Noble MA, Kelly SM, Price NC, Cheesman MR, Smith WE, Munro AW. **Interaction of nitric oxide with cytochrome P450 BM3.** *Biochemistry.* (2004)43(51):16416-31

Ram PA et Waxman DJ. **Thyroid hormone stimulation of NADPH P450 reductase expression in liver and extrahepatic tissues. Regulation by multiple mechanisms.** *J Biol Chem* (1992)267(5):3294-301

Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. et Moore P. *Dans: Textbook of pharmacology, Section 2: Chemical mediators* (2003): 231-243

Rao DN, Elguindi S, et O'Brien PJ **Reductive metabolism of nitroprusside in rat hepatocytes and human erythrocytes.** *Arch Biochem Biophys* (1991)286:30-37.

Raunio H, Hakkola J, Hukkanen J, Lassila A, Paivarinta K, et al. **Expression of xenobiotic-metabolizing CYPs in human pulmonary tissue.** *Exp. Toxicol. Pathol.* (1999)51: 412- 17

Rendic S. **Summary of information on human CYP enzymes : Human P450 metabolism data.** *Drug metab rev.* (2002)34: 83-448

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

Renton K.W., Gray J. D. et Hal R. I. 1, **Decreased elimination of theophylline after influenza vaccination.** *Can Med. Assoc. J.*, (1980)123: 288

Richardson TA et Morgan ET **Hepatic cytochrome P450 gene regulation during endotoxin-induced inflammation in nuclear receptor knockout mice.** *J Pharmacol Exp Ther.* (2005)314(2):703-9

Rosenberger S.F., Finch J.S., Gupta A. et. Bowden G.T., **Extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of JunD and FosB is required for okadaic acid-induced activator protein 1 activation.** *J Biol Chem* (1999)274: 1124-1130

Samaras S. C et Dietz N., Jr. **Physio-. pathology of detoxification of pentobarbital sodium.** *Fed. Proc.*, (1953)12: 122

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

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

Sewer M. B., Koop D. R. et Morgan T., **Endotoxemia in rats is associated with induction of the P4504A subfamily and suppression of several other forms of cytochrome P450.** *Drug metab dispos.* (1996)24: 401

Shedlofsky S.I, Israel B C, McClain C J, Hill D B, et Blouin R A, **Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism,** *Journal of clinical investigation.* (1994)94 : 2209

Shelly M. P., Mendel L. et Park G. R., **Failure of critically ill patients to metabolise midazolam,** *Anesthesia* (1987)42: 619

Shen HM et Liu ZG. **JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species.** *Free Radic Biol Med.* (2006)40(6): 928-39.

Sherman, M. P., Aeberhard EE, Wong VZ, Griscavage JM et Ignarro LJ. **Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993)191: 1301-1308

Shimada T., Misono K.S. et Guengerich F.P. **Human liver microsomal cytochrome P450 mephenytoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. Purification and characterization of two similar forms involved in the reaction.** *J. Biol. Chem.* (1986)261: 909-921

Sindhu RK, Sakai H, Okamoto T et Kikkawa Y. **Differential effect of interleukin-1 alpha on rat hepatic cytochrome P450 monooxygenases** *Toxicology.* (1996)114(1):37-46

Sligar S.G., Cinti D.,L., Gibson G.G. et Schenkman J.B., **Spin state control of the hepatic cytochrome P450 reductase related to catalysis in reconstituted systems.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1979)90: 925-932

Simmons Daniel L, Regina M. Botting et Timothy Hla, **Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition** , *Pharmacol Rev* (2004)56:387-437

Simon H.-U. **Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction,** *Apoptosis* (2000)5: 415–418

Sewerynek E, Abe M, Reiter RJ, Barlow-Walden LR, Chen L, McCabe TJ, Roman LJ et Diaz-Lopez B. **Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-**

induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals. *J Cell Biochem.* (1995)58(4):436-44

Sonne J., Dossing M, Loft S. et Andreasen P. B, **Antipyrine. clearance in pneumonia** *Clin Pharmacol. Ther.* (1985)37: 701

Stanley L.A., Adams D. J., Lindsay R., Meehan R. R., Liao W. et Wolf C. R., **Potential and suppression of mouse liver cytochrome P-450 isozymes during the acute-phase response induced by bacterial endotoxin** *Eur J. Biochem.*, (1988)174: 31

Stone D et Hechter O. **Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals: site of action of ACTH in corticosteroids.** *Arch Biochem Biophys* (1954)51:457 –469

Su L. et David, M. **Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon-alpha/beta receptor. Selective inhibition of STAT. 3 and STAT5 by piceatannol.** *J. Biol. Chem* (2000) 275:12661-12666

Sueyoshi T et Negishi M. **Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (2001)41: 123-143

Taherzadeh M Fradette C, Bleau AM, Jomphe C, Trudeau LE et du Souich P. **The 21-aminosteroid U74389G prevents the down-regulation and decrease in activity of CYP1A1, 1A2 and 3A6 induced by an inflammatory reaction.** *Biochem Pharmacol.* (2006)71(3):366-76

Takahashi K, Akiba Y and Tamura K., **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.* (1997)118(3):301-4.

Takemura S, Minamiyama Y, Imaoka S, Funae Y, Hirohashi K, Inoue M. et Kinoshita M. **Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia,** *Journal of Hepatology* (1999)30(6): 1035-1044

Tamburini PP et Schenkman JB. **Differences in the mechanism of functional interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase and its redox partners.** *Mol Pharmacol* (1986)30(2):178-85

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

Tsujino M, Hirata Y, Imai T, Kanno K, Eguchi S, Ito H et Marumo F. **Induction of nitric oxide synthase gene by interleukin-1 beta in cultured rat cardiocytes.** *Circulation.* (1994)90(1):375-83.

Turowski SG, Jank KE, Fung HL. **Inactivation of hepatic enzymes by inhalant nitrite-in vivo and in vitro studies.** *AAPS J.* (2007)9(3):E298-305.

Tron K, Novosyadlyy R, Dudas J, Samoylenko A, Kietzmann T, Ramadori G **Upregulation of heme oxygenase-1 gene by turpentine oil-induced localized inflammation: involvement of interleukin-6.** *Lab Invest.* (2005)85(3):376-87.

Vermillon J.L., Ballou D. P., Massey V. et Coon M Jr. **Separate Roles for FMN and FAD in Catalysis by Liver Microsomal NADPH-cytochrome P-450 Reductase** *The journal of biological chemistry* (1981)256(1):266-277

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY et Brown RF **A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002),** *J. Biol. Chem.* (1994)269(7):5241-8

Vuppugalla R et Mehvar R **Hepatic disposition and effects of nitric oxide donors: rapid and concentration-dependent reduction in the cytochrome P450-mediated drug metabolism in isolated perfused rat livers.** *J Pharmacol Exp Ther* (2004) 310: 718–727

Wang M., Roberts D.L., Paschke R, Shea T.M., Masters B.S.S. et Kim J-J P. **Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes** *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1997)94(16): 8411–8416

Waxman DJ, Morrissey JJ et Leblanc GA. **Hypophysectomy differentially alters P-450 protein levels and enzyme activities in rat liver: pituitary control of hepatic NADPH cytochrome P-450 reductase.** *Mol Pharmacol* (1989)35(4):519-25

Webb, B.L.J., Hirst S.J. et Giembycz M.A. **Protein kinase C isoenzymes: A review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mito-genesis.** *Br. J. Pharmacol.* (2000)130: 1433-1452

Werck-Reichhart D. et Feyereisen R. **Cytochromes P450: a success story.** *Genome Biology* (2000)1(6), 1-9

White JA, Beckett-Jones B, Guo Y-D, Dilworth FJ., Bonasoro J., Jones G. and Petkovich M. **cDNA Cloning of Human Retinoic Acid-metabolizing Enzyme (hP450RAI) Identifies a Novel Family of Cytochromes P450 (CYP26),** *J. Biol. Chem.*, (1997)272(30): 18538-18541

Wienkers L.C. et Heath T.G., **Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data**, *Nature Reviews Drug Discovery* 4, (2005):825-833

Williams S.N., Dunham E. et Bradfiel C.A., **Induction of Cytochrome P450 Enzymes**. Dans: *Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry*., troisième édition, édité par P.R. Ortiz de Montellano (2005): 323-346

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. **The PPARs: from orphan receptors to drug discovery.**, 2000 *J. Med. Chem.* 43: 527– 50

Wrighton S.A., Brian W.R., Sari M.A., Iwasaki M., Guengerich F.P., Raucy J.L., et al. **Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III_{A5} (HLp3)** *Mol. Pharmacol.* (1990)38: 207-213

Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA et Milburn MV. **Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors.** *Mol. Cell.* (1999)3: 397– 403

Yamazaki H, Nakano M, Imai Y, Ueng Y-F, Guengerich FP et Shimada T) **Roles of cytochrome b5 in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes.** *Arch Biochem Biophys* (1996) 325:174–182

Yoshiko O. et Calhoun W.J., **The role of leukotrienes in airway inflammation** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2006)118(4): 789-798

Yu A., Dong, H., Lang, D. et Haining, R. L. **Characterization of dextromethorphan O- and N-demethylation catalyzed by highly purified recombinant human CYP2D6.** *Drug Metab. Dispos.* (2001)29(11):1362–1365

Yu AM, Idle JR et Gonzalez FJ. **Polymorphic cytochrome P450 2D6: humanized mouse model and endogenous substrates.** *Drug Metab Rev.* (2004)36(2):243-77

Yu R, Chen C, Mo YY, Hebbar V, Owuor ED, Tan TH, Kong AN. **Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism.** *J Biol Chem.* (2000)275(51):39907-13

Zhang Y., J. Piece Wise, T. Holford, H. Zie, P. Boyle, S. Hoar Zahm, J. Rusiecki, K. Zou, B. Zhang, Y. Zhu, P. Owens et T. Zheng. **Serum Polychlorinated Biphenyls, Cytochrome P-450 1A1 Polymorphisms, and Risk of Breast Cancer in Connecticut Women "** *American Journal of Epidemiology* (2004)160 (12): 1177-1183

Zhu Y, Qi C, Jain S, et al. **Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor.** *J. Biol. Chem.* (1997)272: 25500– 6

Zhu Y, Qi C, Calandra C, et al **Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *Gene Expr.* (1996) 6: 185– 95