



**HAL**  
open science

## Cytochromes P450 et tonus vasculaire

Céline Thiebault

► **To cite this version:**

Céline Thiebault. Cytochromes P450 et tonus vasculaire. Médicaments. Université Henri Poincaré - Nancy I, 2004. Français. NNT: . tel-00120305

**HAL Id: tel-00120305**

**<https://theses.hal.science/tel-00120305>**

Submitted on 14 Dec 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I**  
**2004**

---

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT »

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement  
le

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI  
POINCARÉ – NANCY 1**

Mention Sciences du Médicament

par

Céline BERTRAND – THIEBAULT

Née le 21 janvier 1977

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies Métabolisme et Mécanisme  
d'Action des Médicaments, Pharmacologie Clinique.

Sujet : Cytochromes P450 et Tonus Vasculaire

**MEMBRES DU JURY**

Juges : Pr. Anne-Marie Batt  
Dr Jean-François Renaud de la Faverie  
Dr Sophie Visvikis

Rapporteurs : Pr Lysiane Richert  
Pr Yves Arthur

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION.</b>	<b>2</b>
<b>I. Les cytochromes P450 dans les tissus cardiaques et vasculaires.</b>	<b>2</b>
1. Généralités.	2
1.1. Classification.	3
1.2. Structure.	4
1.3. Cycle réactionnel.	4
1.4. Fonctions biologiques des cytochromes P450.	6
2. Place des cytochromes P450 dans le métabolisme de l'acide arachidonique.	8
2.1. Le métabolisme de l'acide arachidonique.	8
2.1.1. Les cyclooxygénases.	8
2.1.1.1. Cyclooxygénase de type 1.	9
2.1.1.2. Cyclooxygénase de type 2.	9
2.1.2. Les lipoxygénases.	11
2.1.3. Les cytochromes P450.	11
2.1.3.1. Oxydation bis-allylique.	11
2.1.3.2. Hydroxylations aux C <sub>16</sub> -C <sub>20</sub> .	11
2.1.3.3. Réaction d'époxygénase (Olefine epoxydation).	12
3. Localisation et rôles vasculaires des cytochromes P450.	13
3.1. Les cytochromes P450 de la famille 1.	13
3.1.1. Les cytochromes P450 de la famille 1A.	13
3.1.2. Le cytochrome P450 1B1.	14
3.2. Les cytochromes P450 de la famille 2.	15
3.2.1. Les cytochromes P450 2B.	15
3.2.2. Les cytochromes P450 2C.	15
3.2.2.1. Le cytochrome P450 2C8.	16
3.2.2.2. Le cytochrome P450 2C9.	17
3.2.2.3. Le cytochrome P450 2C18.	18
3.2.2.4. Le cytochrome P450 2C19.	18
3.2.3. Le cytochrome P450 2E1.	19

3.2.4. Le cytochrome P450 2J2.	19
3.3. Les cytochromes P450 de la famille 3A.	20
3.3.1. Le cytochrome P450 3A4.	20
3.3.2. Le cytochrome P450 3A5.	21
3.3.3. Le cytochrome P450 3A7.	21
3.4. Les cytochromes P450 de la famille 4.	22
3.4.1. Le cytochrome P450 de la famille 4A.	22
3.4.1.1. Le cytochrome P450 4A9.	22
3.4.1.2. Le cytochrome P450 4A11.	22
3.4.2. Les cytochromes P450 de la famille 4F.	23
3.4.2.1. Le cytochrome P450 4F2.	24
3.4.2.2. Le cytochrome P450 4F3.	24
3.4.2.3. Le cytochrome P450 4F8.	24
3.4.2.4. Le cytochrome P450 4F11.	25
3.4.2.5. Le cytochrome P450 4F12.	25
3.5. Les cytochromes P450 5A1.	25
3.6. Le cytochrome P450 8A1.	26
<b>II. Le tonus vasculaire.</b>	<b>28</b>
1. Définition.	28
2. Contrôle du tonus vasculaire.	28
3. Facteurs impliqués dans le tonus vasomoteur.	30
3.1. Facteurs vasoconstricteurs.	30
3.1.1. L'acide 20 hydroxyeicosatetraénoïque (le 20-HETE).	30
3.1.2. Les endothélines.	31
3.1.3. Les prostaglandines.	32
3.2. Facteurs vasodilatateurs.	32
3.2.1. Facteur Endothélial Hyperpolarisant, <i>Endothelium Derived Hyperpolarising Factor</i> ou EDHF.	32
3.2.2. L'oxyde nitrique : le NO.	34
3.2.3. Les acides epoxyeicosatriénoïques : les EETs.	35
3.2.4. La prostacycline.	36
4. Régulation du tonus vasculaire.	37

<b>III. La pathologie variqueuse.</b>	<b>39</b>
1. Les veines.	39
1.1. Structure.	39
1.2. Les différents types cellulaires de la paroi vasculaire et leur rôle (figure 7).	41
1.2.1. Les cellules musculaires lisses.	41
1.2.2. Les cellules endothéliales.	42
1.2.3. La matrice extracellulaire.	43
2. Les veines variqueuses.	44
2.1. Facteurs intervenant dans la pathologie variqueuse.	45
2.1.1. Facteurs mécaniques.	45
2.1.2. Facteurs chimiques.	45
2.1.2.1. L'hypoxie.	45
2.1.2.2. Facteurs de croissance.	46
2.1.2.3. Les espèces réactives de l'oxygène.	47
2.1.2.4. Réaction inflammatoire.	48
2.2. Le remodelage vasculaire.	48
2.3. Modifications cellulaires.	49
2.3.1. Modification des cellules musculaires lisses.	49
2.3.2. Modification des cellules endothéliales.	50
2.3.3. Modification des macrophages.	51
<b>IV. Régulation des cytochromes P450 présents dans les tissus cardiovasculaires.</b>	<b>53</b>
1. La régulation.	53
1.1. Définition.	53
1.1.1. Le récepteur CAR.	54
1.1.2. Le récepteur PXR.	56
1.1.3. Le récepteur GR.	58
1.1.4. Les récepteurs PPAR.	59
1.2. La régulation des cytochromes P450.	60
1.2.1. Le cytochrome P450 1B1.	60
1.2.2. Les cytochromes P450 de la famille 2C.	61
1.2.2.1. Le cytochrome P450 2C8.	61
1.2.2.2. Le cytochrome P450 2C9.	61
1.2.2.3. Le cytochrome P450 2C18.	62

1.2.2.4. Le cytochrome P450 2C19.	62
1.2.3. Le cytochrome P450 2E1.	63
1.2.4. Le cytochrome P450 2J2.	63
1.2.5. Les cytochromes P450 de la famille 3A.	63
1.2.5.1. Le cytochrome P450 3A4.	63
1.2.5.2. Le cytochrome P450 3A5.	65
1.2.5.3. Le cytochrome P450 3A7.	65
1.2.6. Le cytochrome P450 4A11.	66
1.2.7. Les cytochromes P450 de la famille 4F.	67
1.2.7.1. Le cytochrome P450 4F2.	67
1.2.7.2. Le cytochrome 4F12.	67
1.2.8. Le cytochrome 5A1.	67
2. Les statines.	67
2.1. Définition.	67
2.2. Les effets pleiotropiques.	68
2.2.1. Statines et prolifération cellulaire.	68
2.2.2. Statines et tonus vasculaire.	68
2.2.3. Statines et inflammation.	69
2.3. Les statines et les acides gras.	69
<b>V. Polymorphisme génétique des cytochromes P450 et pathologie cardiovasculaire.</b>	<b>71</b>
1. Généralités.	71
2. Polymorphisme génétique des cytochromes P450.	72
2.1. Le cytochrome P450 1A1	72
2.2. Le cytochrome P450 1B1.	72
2.3. Les cytochromes P450 de la famille 2C.	73
2.3.1. Le cytochrome P450 2C8.	73
2.3.2. Le cytochrome P450 2C9.	73
2.3.3. Le cytochrome P450 2C18.	75
2.3.4. Le cytochrome P450 2C19.	75
2.4. Le cytochrome P450 2E1.	76
2.5. Le cytochrome P450 2J2.	76
2.6. Les cytochromes P450 de la famille 3A.	78

2.6.1. Le cytochrome P450 3A4.	78
2.6.2. Le cytochrome P450 3A5.	79
2.6.3. Le cytochrome P450 3A7.	80
2.7. Le cytochrome P450 4A11.	80
2.8. Les cytochromes P450 de la famille 4F.	80
2.8.1. Le cytochrome P450 4F2.	80
2.8.2. Le cytochrome P450 4F12.	80
2.9. Le cytochrome P450 5A1.	81
2.10. Le cytochrome P450 8A1.	81

## **MATERIEL ET METHODES**

<b>I. Populations étudiées.</b>	<b>84</b>
1. Echantillons de veines saphènes humaines.	84
2. La Cohorte Stanislas.	84
<b>II. Mesure des paramètres biologiques.</b>	<b>85</b>
1. Données médicales.	85
2. Données biologiques.	85
<b>III. Culture cellulaire.</b>	<b>85</b>
1. Les cellules.	86
1.1. Cellules HSaVEC.	86
1.2. Cellules ECV304.	87
1.3. Cellules musculaires lisses.	88
1.4. Cellules HepG2.	89
1.5. Conditions de conservation.	90
2. Tests de cytotoxicité	90
2.1. Test du MTT.	90
2.2. Test d'exclusion au bleu Trypan.	91
3. Traitements des cellules.	92
3.1. Préparation des solutions.	92
3.2. Traitements.	93
<b>IV. Etudes biochimiques.</b>	<b>93</b>
1. Dosage des protéines selon la méthode de Lowry.	93
2. Préparation des microsomes.	93

3. Western Blot.	94
3.1. Préparation des gels.	94
3.2. Préparation du marqueur et des échantillons.	95
3.3. Transfert des protéines du gel sur une membrane (ImmobilonP).	96
3.4. Saturation de la membrane.	97
3.5. Fixation des anticorps.	97
3.6. Révélation.	97
<b>V. Biologie moléculaire.</b>	<b>98</b>
1 Extraction des acides ribonucléiques.	98
2. Quantification des ARNs.	99
3. Technique de détection des ARNm.	99
3.1. Réaction de <i>reverse transcription</i> .	99
3.2. La <i>polymerase chain reaction (PCR)</i> .	100
3.2.1. La PCR semi-quantitative.	102
3.2.2. La PCR quantitative.	102
<b>VI. Etudes de polymorphisme.</b>	<b>104</b>
<b>VII. Etudes statistiques.</b>	<b>107</b>
<b>RESULTATS</b>	
<b>I. Enzymes impliquées dans la production de molécules vasoactives.</b>	<b>108</b>
1. Expression des enzymes vaso-actives dans les tissus veineux humains.	109
1.1. Expression des cytochromes P450.	110
1.1.1. Le cytochrome P450 1B1.	110
1.1.2. Le cytochrome P450 2C total.	112
1.1.3. Le cytochrome P450 2E1.	113
1.1.4. Le cytochrome P450 2J2.	115
1.1.5. Le cytochrome P450 3A5.	116
1.1.6. Le cytochrome P450 4A11.	118
1.1.7. Les cytochromes P450 dans les veines saphènes humaines.	119
1.2. Expression des cyclooxygénases.	120
1.2.1. Cyclooxygénase de type 1.	121
1.2.2. Cyclooxygénase de type 2.	122



1.3. Expression des NO synthases.	123
2. Volume des cellules musculaires lisses issues des tissus des veines saphènes.	124
3. Expression des enzymes vaso-actives dans les cellules humaines.	125
3.1. Les cellules endothéliales.	125
3.1.1. Les cytochromes P450.	125
3.1.2. Les cyclooxygénases.	126
3.1.3. Les récepteurs nucléaires.	126
3.2. Les cellules musculaires lisses.	128
3.2.1. Les cytochromes P450.	128
3.2.2. Les cyclooxygénases.	129
3.2.3. Les récepteurs nucléaires.	129
4. Etudes de corrélations.	130
5. Discussion.	132
<b>II. Etude de régulation des cytochromes P450 2C, 2J2 et 3A5 par les statines.</b>	<b>140</b>
1. Introduction	140
2. Cytotoxicité <i>in vitro</i> des statines.	142
3. Effet des statines sur l'expression des cytochromes P450.	143
3.1. Les cytochromes P450 de la famille 2C.	143
3.1.1. Le cytochrome P450 2C total.	143
3.1.2. Le cytochrome P450 2C9.	145
3.1.3. Le cytochrome P450 2C8.	146
3.1.4. Etude de l'expression de la protéine de CYP2C9.	147
3.2. Le cytochrome P450 2J2.	148
3.3. Les cytochromes P450 de la famille 3A.	149
4. Effet des statines sur les récepteurs nucléaires.	151
4.1. Le récepteur CAR.	152
4.2. Le récepteur PXR.	152
4.3. Le récepteur GR.	153
5. Discussion.	155
<b>III. Etudes de polymorphisme.</b>	<b>138</b>
<b>A. Polymorphismes de CYP2J2, CYP2C19 et hypertension.</b>	<b>162</b>
1. Polymorphisme de CYP2C19.	162

2. Etude de la fréquence allélique des SNP 681 et 990.	162
3. Polymorphisme et pression sanguine.	163
4. Discussion.	164
<b>B. Polymorphisme et marqueurs inflammatoires.</b>	<b>165</b>
1. Etude de la fréquence allélique.	166
2. Interleukine-6.	167
3. Autres marqueurs inflammatoires.	167
4. Polymorphisme et paramètres lipidiques.	169
5. Discussion.	171
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.</b>	<b>176</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.</b>	<b>179</b>

## AVANT PROPOS.

Ce travail se situe au croisement de l'expérience du laboratoire sur le rôle des cytochromes P450 (CYPs) et de recherches plus récentes concernant les gènes candidats en pathologie cardiovasculaire.

Il est en effet démontré que des cytochromes P450 sont exprimés dans les tissus cardiaques et vasculaires ou dans les cellules qui en dérivent. Plusieurs cytochromes P450 sont capables de métaboliser l'acide arachidonique en métabolites vasodilatateurs ou vasoconstricteurs et donc de jouer un rôle dans le tonus vasculaire. Ces cytochromes sont régulés par de nombreux facteurs tels que certaines conditions physiologiques ou des substances exogènes. Enfin, les cytochromes P450 présentent de nombreux polymorphismes. Les différentes formes polymorphiques de ces cytochromes P450 produisent des enzymes moins actives voire inactives. Ce qui peut avoir des conséquences dans le métabolisme des médicaments et dans certaines pathologies.

Notre hypothèse est que les voies CYP-dépendantes de la cascade de l'acide arachidonique jouent un rôle majeur dans le tonus vasculaire.

Après avoir examiné ces différents arguments, au vu de l'importance des cytochromes P450 dans le système vasculaire, nous nous sommes attachés au rôle des cytochromes P450 dans le tonus veineux et plus précisément leur rôle dans la pathologie variqueuse. Pour cela, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'expression des enzymes impliquées dans la production de molécules vaso-actives dans les tissus de veines saphènes humaines, mais également à leur expression dans des cellules issues de tissus vasculaires. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des études de régulation par des molécules hypocholestérolémiantes : les statines. En effet, ces molécules présentent un intérêt grandissant dans les pathologies cardiovasculaires. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux cytochromes P450 dont l'expression est la plus affectée dans la pathologie variqueuse. Enfin dans une dernière partie, nous avons étudié les polymorphismes du CYP2C19 et leur implication dans le métabolisme de l'acide arachidonique et la composante inflammatoire des pathologies cardiovasculaires.

# INTRODUCTION

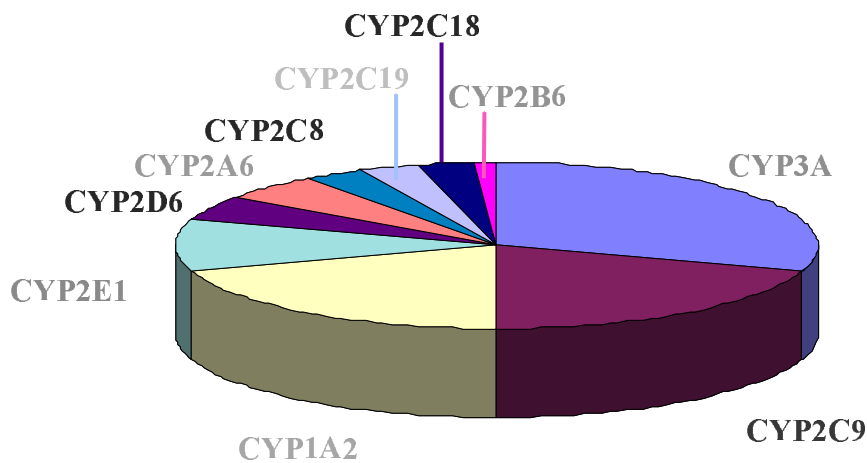
## I. Les cytochromes P450 dans les tissus cardiaques et vasculaires.

### 1. Généralités.

Les cytochromes P450 (CYP) forment une superfamille multigénique d'enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif de molécules très diverses, comprenant aussi bien des xénobiotiques (médicaments, pesticides, toxiques, cancérigènes...) que des substances endogènes (hormones stéroïdiennes, acides gras, vitamines,...). Les cytochromes P450 ont tous en commun un thiolate comme ligand axial du fer au centre de l'hème. Ce sont d'ailleurs les propriétés de ce chromophore qui lui ont donné son nom : en 1963, deux chercheurs japonais, Sato et Omura, ont appelé « pigment P450 » le composé responsable du pic d'absorbance à 450 nm qui apparaît quand on sature en monoxyde de carbone une préparation subcellulaire de glandes surrénales par le dithionite de sodium. Les cytochromes P450 se trouvent dans la plupart des êtres vivants : dans les archaebactéries, des eubactéries, des plantes, des animaux... Chez les mammifères et notamment chez l'homme, les cytochromes P450 sont présents dans presque tous les tissus, sauf le muscle, les os et les globules rouges. Les organes particulièrement riches en cytochromes P450 sont le foie et les glandes surrénales.

Les réactions de bio-transformation des xénobiotiques catalysées par les cytochromes P450 s'inscrivent dans un processus de détoxification évitant l'accumulation de substances potentiellement toxiques dans l'organisme. La grande diversité des molécules rencontrées a conduit au cours de l'évolution à une importante variabilité inter- et intra-espèce en terme de profil métabolique. Une des caractéristiques de ces enzymes est leur inductibilité, en particulier par certaines hormones, médicaments ou polluants chimiques. Paradoxalement ces enzymes peuvent parfois catalyser l'activation chimique de certains composés et produire des métabolites toxiques, mutagènes voire cancérigènes. Chez l'homme les formes

quantitativement prépondérantes de cytochromes P450 sont représentées par les sous-familles CYP1, CYP2C et CYP3A (figure 1).



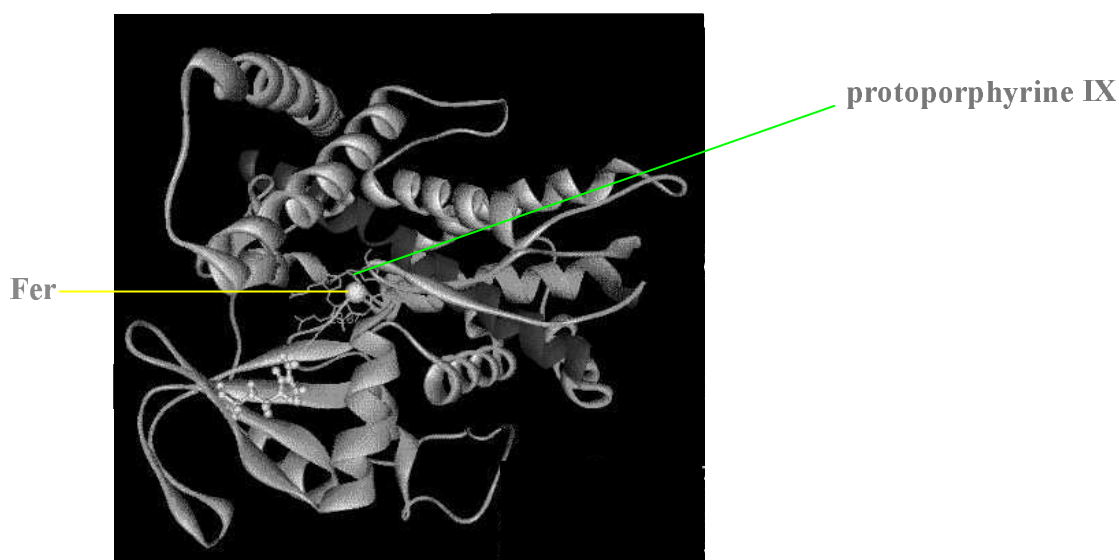
*Figure 1 : Répartition des cytochromes P450 dans le foie humain.*

### **1.1. Classification.**

Nelson *et al.*, (1996) recensait en 1995, 481 gènes et 22 pseudo-gènes codant pour des cytochromes P450. Ces gènes ont été décrits chez 85 eucaryotes, incluant vertébrés, invertébrés, plantes et algues et 20 procaryotes. De nombreux autres cytochromes P450 ont été isolés depuis et plus de 1000 sont aujourd'hui clairement identifiés. Depuis 1987, ces protéines sont répertoriées et désignées selon une nomenclature basée uniquement sur le pourcentage d'homologie entre les séquences en acides aminés (Nebert *et al.*, 1987), les similitudes en terme d'activité enzymatique et de régulation ne sont pas prises en compte (Nelson *et al.*, 1993). Ainsi, deux cytochromes P450 appartiennent à la même famille lorsque leurs séquences en acides aminés présentent une homologie supérieure à 40 %. Si l'homologie est supérieure à 55% les protéines font partie de la même sous-famille. Les protéines ayant moins de 3 % de divergence sont classées comme variants alléliques. On dénombre actuellement 17 familles de cytochromes P450 chez l'homme, comportant 50 gènes et 15 pseudo gènes (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>).

## 1.2. Structure.

Les cytochromes P450 sont composés d'une partie protéique, l'apoprotéine et d'un groupement prosthétique constitué d'une protoporphyrine IX liée à un atome de fer par quatre liaisons covalentes (figure 2). La cinquième liaison de coordination du fer est réalisée avec le groupement thiolate d'une cystéine conservée et positionnée dans le site catalytique. Enfin, la sixième liaison permet la fixation de diverses molécules comme l'eau et l'oxygène moléculaire. Le spectre d'absorption du CYP à l'état ferrique va dépendre du sixième ligand.

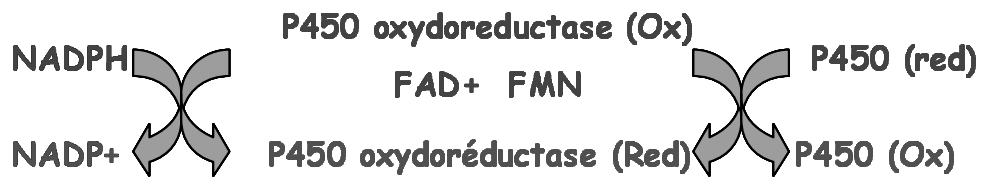


*Figure 2 : Représentation tridimensionnelle du cytochrome P450 4A.*

## 1.3. Cycle réactionnel.

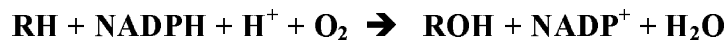
Les cytochromes P450 sont associés à des chaînes de transfert d'électrons distinctes suivant leurs localisations microsomales ou mitochondriales mais qui utilisent toutes les deux la NADPH comme source d'électrons. Les CYPs du réticulum endoplasmique sont réduits par une protéine membranaire, la NADPH cytochrome P450 réductase. Cette protéine comporte deux domaines contenant chacun une flavine. Deux électrons sont ainsi transmis du FAD au FMN puis à l'ion ferrique  $Fe^{3+}$  de l'hème du cytochrome. Pour les cytochromes

mitochondriaux, la chaîne de transfert des électrons comporte, outre une réductase à flavine, une composante supplémentaire (protéine Fer-Soufre), la ferredoxine (adrénodoxine dans les glandes surrénales) qui joue le rôle de donneur d'électrons (figure 3).

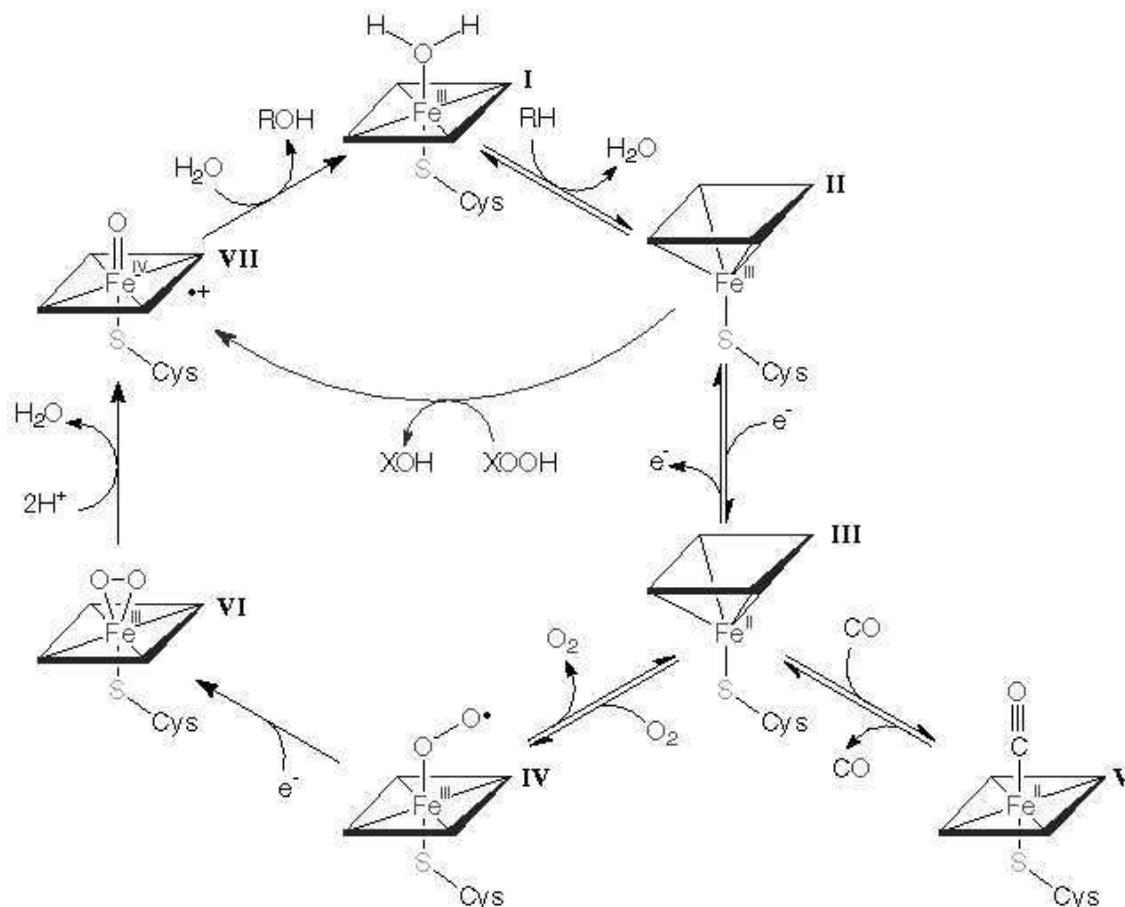


*Figure 3 : Chaîne de transfert d'électrons associées aux cytochromes P450.*

Dans la réaction type, le cytochrome P450 transforme un substrat hydrophobe en produit hydrophile, souvent par l'introduction d'une fonction hydroxyle. Cette réaction nécessite une molécule d'oxygène, deux protons et deux électrons. La séquence d'événements qui conduit à cette réaction peut s'écrire suivant le bilan global :



Le cycle réactionnel des cytochromes P450 représenté sur la figure 4 peut se résumer de la façon suivante : le substrat est tout d'abord fixé sur le site actif de l'enzyme et remplace ainsi la molécule d'eau liée à la forme ferrique du fer. Le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est réduit en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par transfert d'un électron de la NADPH réductase sur le fer ferrique. L'oxygène moléculaire se fixe sur la sixième liaison de l'atome de fer. Un électron supplémentaire est alors ajouté et réduit le dioxygène ferreux en complexe activé capable de réagir avec le substrat. Deux protonations successives sont nécessaires pour libérer une molécule d'eau. Il se produit ensuite un transfert de protons du substrat vers l'oxygène et formation d'intermédiaires radicalaires  $\text{OH}^\circ$  et  $\text{R}^\circ$ . Le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\circ$ ) se lie au radical  $\text{R}^\circ$ , (à ce stade, il peut y avoir formation de radicaux libres dans la cellule pouvant générer un stress oxydant). La réaction se termine par la libération du produit du groupement hémunique.



*Figure 4 : Cycle réactionnel des cytochromes P450.*

#### **1.4. Fonctions biologiques des cytochromes P450.**

Environ 40 types de réactions d'oxydation différentes sont catalysées par les cytochromes P450 ce qui montre la grande diversité d'action de ces enzymes. De ce fait, le nombre de molécules chimiques pouvant servir de substrat est très grand (Hasler, 1999).

Les fonctions biologiques des cytochromes P450 peuvent se diviser en deux domaines d'importance égale : d'une part le métabolisme de substances endogènes, d'autre part le



métabolisme de xénobiotiques. Les principaux types d'activités observées pour les cytochromes P450 sont :

- une activité monooxygénase qui produit des réactions d'hydroxylation, d'époxidation, de N-hydroxylation, de O-dealkylation,
- une activité oxydase comprenant des réactions d'hydroxylation aromatique et d'oxydation de fonctions alcooliques.
- une activité réductase agissant notamment sur des fonctions azotées ou halogénées.
- enfin une activité peroxydase .

Les principales réactions catalysées par les cytochromes P450 dans le métabolisme des substances endogènes ont trait à l'hydroxylation des stéroïdes, des vitamines A et D et des acides biliaires (Kagawa et Waterman, 1995) mais d'autres réactions telles que le métabolisme de l'acide arachidonique semblent tout aussi importantes pour l'organisme notamment au niveau vasculaire (Fleming, 2001).

Les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques montrent des spécificités larges et croisées pour de nombreux substrats. En effet, la spécificité de substrats des cytochromes P450 est relative (un cytochrome P450 peut métaboliser plusieurs substrats) et chevauchante (un substrat peut être métabolisé par plusieurs cytochromes P450).

Le système monooxygénase participe à la biosynthèse d'hormones stéroïdes et au métabolisme de substances endogènes et exogènes. Parmi les substances endogènes, on trouve par exemple les stéroïdes et des acides gras tels que l'acide arachidonique. Les cytochromes P450 métabolisent de nombreux composés étrangers à l'organisme tels que les médicaments, les drogues et les polluants. Certains composés métabolisés par ce système peuvent devenir cancérigènes sans être éliminés par l'organisme, c'est le cas notamment de composés aromatiques tels que le benzo-pyrène.

Les différentes réactions catalysées par les cytochromes P450 et la multitude de substrats métabolisés par ces derniers montre l'importance de ces enzymes dans les systèmes biologiques. La place des cytochromes P450 dans le métabolisme est aujourd'hui bien connu contrairement à leur rôle dans la fonction vasculaire qui commence à être étudié depuis quelques années seulement. C'est pourquoi, notre intérêt pour les tissus vasculaires veineux

nous a conduit à rechercher l'expression des cytochromes P450 dans ces tissus et nous avons dressé une sorte d'inventaire de l'expression de ces enzymes.

## **2. Place des cytochromes P450 dans le métabolisme de l'acide arachidonique.**

### **2.1. Le métabolisme de l'acide arachidonique.**

Le métabolisme de l'acide arachidonique se fait par trois voies : la voie des cyclooxygénases, la voie des lipoxygénases et celle des cytochromes P450, plus récemment décrite (Rahman *et al.*, 1997) (figure 5).

#### **2.1.1. Les cyclooxygénases.**

Ces enzymes sont également appelées prostaglandines endoperoxyde synthase. Deux isoformes de cyclooxygénase ont été identifiées : La cyclooxygénase de type 1 (COX-1 ou PTGS1) codée par un ARNm de 2.8 kb ainsi qu'une forme inductible par les mitogènes : la cyclooxygénase de type 2 (COX-2 ou PTGS2) codée par un ARNm de 4.5 kb (Jones *et al.*, 1993). Les cyclooxygénases sont des enzymes régulatrices de la synthèse des prostaglandines. Les COX-1 et COX-2 réalisent deux fonctions enzymatiques :

- un rôle de cyclooxygénase, elles convertissent l'acide arachidonique en prostaglandine (PGG<sub>2</sub>)
- un rôle de peroxydase, elles convertissent la prostaglandine PGG<sub>2</sub> en prostaglandine PGH<sub>2</sub>.

Les deux formes COX-1 et COX-2 sont exprimées dans des cellules impliquées dans les processus inflammatoires. Chez l'homme, la cyclooxygénase de type 1 est exprimée dans les cellules musculaires lisses artérielles alors que la cyclooxygénase de type 2 a été trouvée dans les cellules endothéliales (Komhoff *et al.*, 1997). La cyclooxygénase de type I est constitutive alors que la cyclooxygénase de type 2 est régulée. Les glucocorticoïdes anti-inflammatoires sont des inhibiteurs potentiels de ces enzymes.

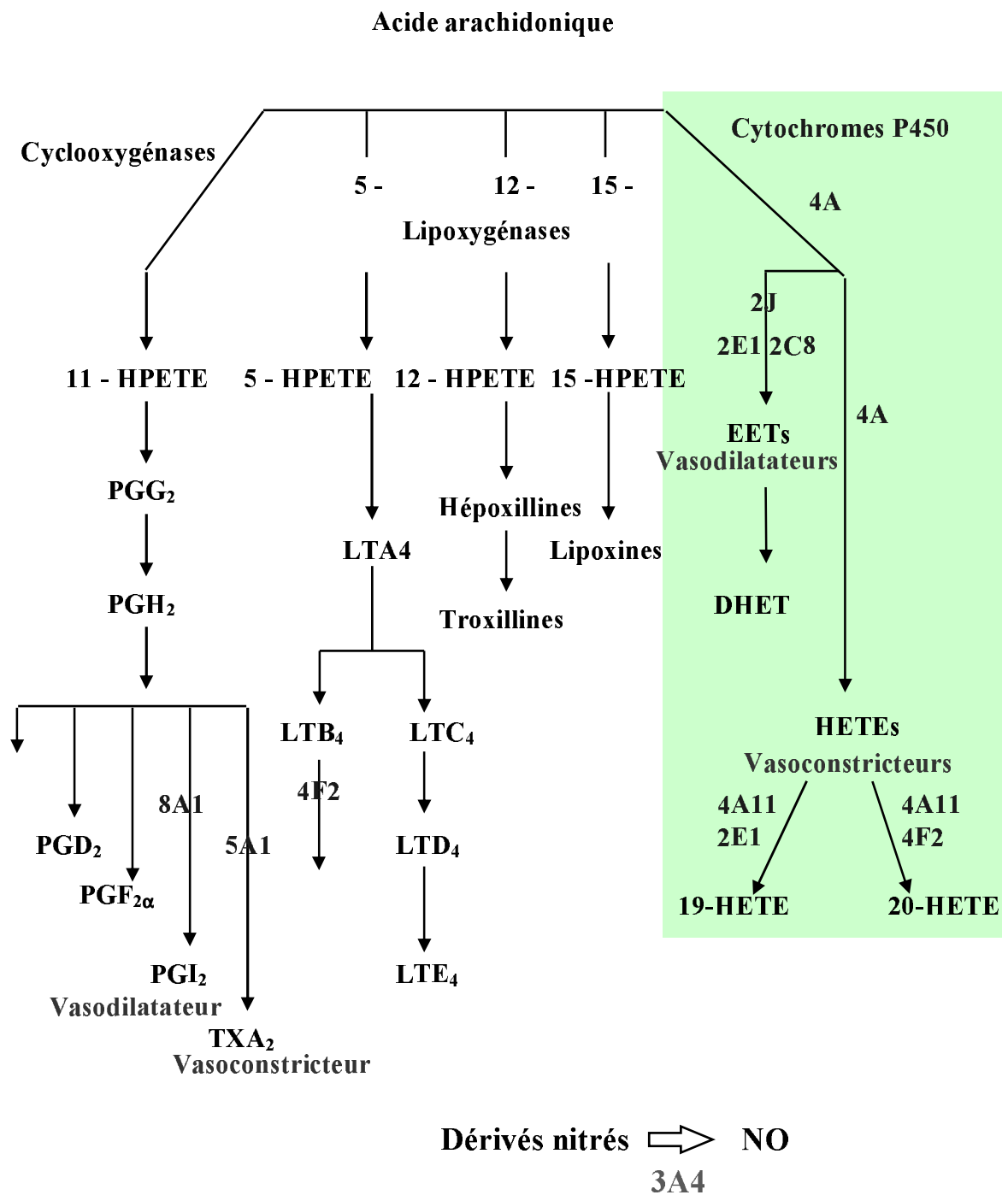
### **2.1.1.1. Cyclooxygénase de type 1.**

Cette enzyme intervient dans l'agrégation plaquettaire. L'action sur l'agrégation plaquettaire se fait par l'intermédiaire du thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). La cyclooxygénase de type-1 joue également un rôle essentiel dans les mécanismes de reproduction par l'intermédiaire de la prostaglandine PGF<sub>2α</sub> (Smith et Lagenbach, 2001).

### **2.1.1.2. Cyclooxygénase de type 2.**

La forme inductible des cyclooxygénases : COX-2 est associée à l'inflammation vasculaire et la prolifération cellulaire. En effet, le taux d'ARNm de COX-2 augmente rapidement après traitement par l'interleukine-1 dans les monocytes humains et diminue après traitement par des glucocorticoïdes alors que le taux de COX-1 ne change pas. Schmedtje *et al.*, (1997) ont montré que l'hypoxie augmente l'expression du gène de COX-2 dans les cellules endothéliales vasculaires humaines indépendamment d'autres stimuli.

Cette enzyme semble intervenir dans ces cellules au niveau de la libération de certains facteurs stimulateurs de colonies tels que le GM-CSF et G-CSF après stimulation par différentes cytokines. Ces facteurs stimulateurs de colonies sont décrits comme étant des inhibiteurs de l'apoptose des leucocytes (Stanford *et al.*, 2001). La cyclooxygénase de type 2 est induite par des cytokines pro-inflammatoires mais également par des facteurs de croissance ce qui lui confère un rôle dans la réaction inflammatoire mais également dans la croissance cellulaire (Vane *et al.*, 1998).



*Figure 5: Schéma du métabolisme de l'acide arachidonique et production de molécules vaso-actives.*

### 2.1.2. Les lipoxygénases.

Les lipoxygénases métabolisent l'acide arachidonique en leucotriènes et en HETEs. Les métabolites des lipoxygénases sont principalement produits par les leucocytes, les cellules mastocytaires et les macrophages en réponse à l'inflammation (Imig *et al.*, 2000). En effet, les métabolites des lipoxygénases 12-HETE, 15-HETE et leucotriènes sont impliqués dans la réponse inflammatoire (Ma *et al.*, 1991 ; Badr, 1997). Il a également été démontré que les vaisseaux produisent du 12-HETE et du 15-HETE (Albrightson, *et al.*, 1994) qui ont un rôle de vasoconstricteur (Katoh *et al.*, 1992) et du 5-HETE pour lequel il a été démontré un rôle dans l'hypertension pulmonaire (Voelkel *et al.*, 1996).

### 2.1.3. Les cytochromes P450.

Les P450 monooxygénases métabolisent l'acide arachidonique par une ou plusieurs des réactions suivantes (figure 5) :

- L'oxydation bis-allylique, réaction *lipoxygénases like*.
- Les hydroxylations au niveau du carbone sp<sup>3</sup> de l'acide arachidonique.
- L'époxydation des « olefines », l'époxygénase de l'acide arachidonique qui donne 4 acides epoxyeicosatriénoïques regioisomères (5, 6- ; 8, 9- ; 11, 12 – et 14, 15-EET).

#### 2.1.3.1. Oxydation bis-allylique.

L'activité *lipoxygénase like* des cytochromes P450 microsomaux produit 6 alcools allyliques regioisomères : les acides hydroxyeicosatetraénoïques (HETEs) : 5-, 8-, 9-, 11-, 12-, 15-HETE contenant une fonctionnalité caractéristique dienol cis-trans conjuguée.

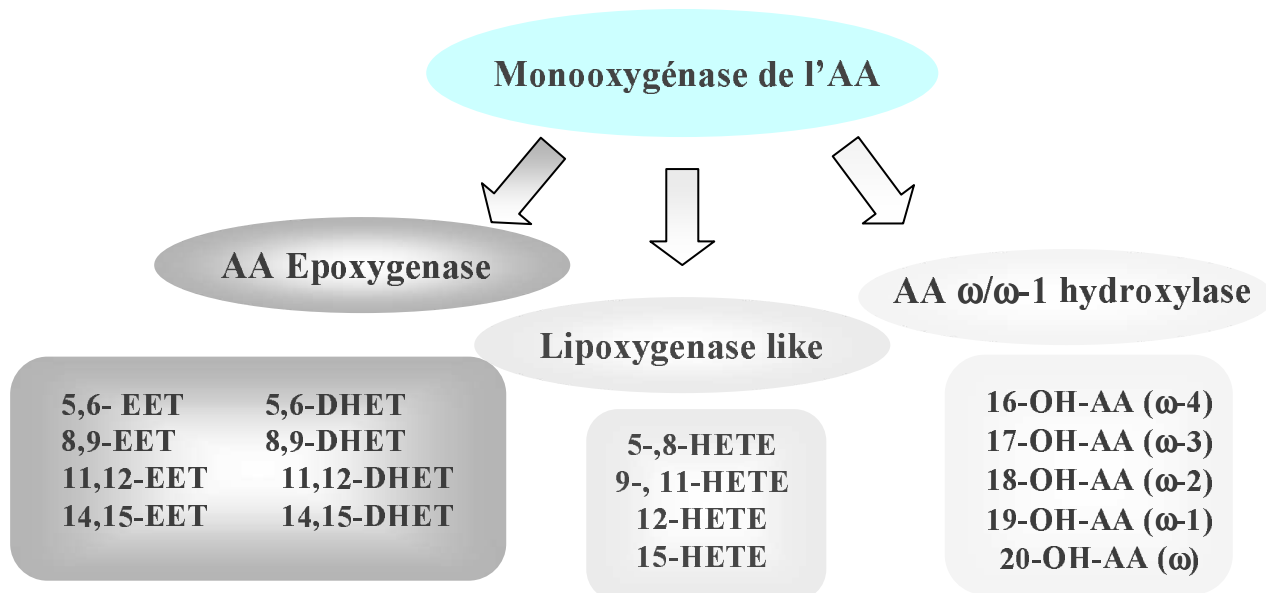
#### 2.1.3.2. Hydroxylations aux C<sub>16</sub>-C<sub>20</sub>.

L' $\omega$ ,  $\omega$ -1 hydroxylation des acides gras saturés est une des plus ancienne et des mieux caractérisée des activités enzymatiques attribuées aux cytochromes P450. En terme de taux de réaction et d'efficacité catalytique, les acides gras saturés et les acides lauriques en particuliers sont généralement des meilleurs substrats que l'acide arachidonique pour les hydroxylases  $\omega/\omega$ -1 (Capdevila *et al.*, 2000).

La biologie moléculaire, biochimique et enzymatique montre que les isoformes 4A sont des hydroxylases  $\omega/\omega-1$  des acides gras prédominantes dans la plupart des tissus des mammifères (Oliw *et al.*, 1994, Harder *et al.*, 1995).

### 2.1.3.3. Réaction d'époxygénase (Olefine epoxydation).

Des reconstitutions des activités monooxygénases indiquent que les époxygénases de l'acide arachidonique sont des membres de la famille 2 : 2C8, 2C9/10, 2C18 et 2C19 (Zeldin *et al.*, 1995, Zeldin *et al.*, 1996 ; Rifkind *et al.*, 1995). CYP2J2, a été identifié comme étant une époxygénase organe-spécifique (Wu *et al.*, 1996).



**Figure 6 :** Différents types de métabolisations de l'acide arachidonique par les cytochromes P450.

De nombreuses publications ont montré que l'acide arachidonique est métabolisé par les cytochromes P450 en EETs, diHETEs et 19-, 20-HETE. Il semble évident que ces métabolites occupent une position centrale en tant que facteurs paracrines et seconds messagers dans la régulation des fonctions pulmonaires, rénale et vasculaires (Roman *et al.*, 2000).

Nous présenterons ci-après les sous – familles de cytochromes P450 impliqués dans la production de molécules vaso-actives et nous décrirons brièvement la localisation et le rôle vasculaire de ces différents cytochromes P450.

### **3. Localisation et rôles vasculaires des cytochromes P450.**

Depuis quelques années, plusieurs études ont souligné l'importance des cytochromes P450 dans le tonus vasculaire, c'est pourquoi nous avons jugé important de décrire les localisations tissulaires et cellulaires des cytochromes P450 et de leurs métabolites dans le tonus vasculaire. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux sous-familles 1B, 2C, 2E, 2J, 3A, 4A, 4F, 5A et 8A. Les sous familles 1A et 2B sont également présentes dans des organes vasculaires mais leur rôle dans la production de molécules vaso-actives est actuellement peu décrit, nous ne ferons donc qu'une brève description de ces deux sous-familles.

#### **3.1. Les cytochromes P450 de la famille 1.**

##### **3.1.1. Les cytochromes P450 de la famille 1A.**

Cette sous-famille comporte deux membres CYP1A1 et CYP1A2. ces deux cytochromes ont été détectés dans les cellules HUVEC (Farin *et al.*, 1994). Dans les tissus cardiaques et artériels humains, Thum et Borlak, (2000) ont détecté l'ARNm du CYP1A1 chez certains patients seulement dans l'oreillette droite, le ventricule droit, l'artère pulmonaire, l'oreillette gauche, le ventricule gauche, l'aorte et dans les cellules endothéliales d'artères humaines (Thum et Borlak, 2004). L'ARNm de CYP1A2 n'a été détecté que dans quelques oreillettes gauches et dans les aortes.

L'implication des CYP1A1 et 1A2 dans le métabolisme de l'acide arachidonique a été très controversée. Les CYP1A1 et 1A2 sont des  $\omega$ ,  $\omega$ -1 oxygénases (hydroxylases) de l'acide arachidonique, actives en C19 et C16 respectivement (Falck *et al.*, 1990), elles ne produisent qu'une quantité faible et variable d'acides epoxyeicosatriénoïques (EETs) (Hasler, 1999). Toutefois, Gannon *et al.* (2000) affirment que le CYP1A1 des cellules endothéliales n'est pas une époxygénase de l'acide arachidonique et par conséquent pas un facteur hyperpolarisant de l'endothélium ou *Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF). Cependant, cela ne signifie pas que le CYP1A1 n'oxyde pas l'acide arachidonique pour produire des substances

vasodilatatrices puisque l'induction de CYP1A provoque une augmentation de l'hyperpolarisation (Adeagbo *et al.*, 1997).

### 3.1.2. Le cytochrome P450 1B1.

Le CYP1B1 est localisé sur le chromosome 2, 2p22-p21, il possède 3 exons et 2 introns (Tang *et al.*, 1996). Le cytochrome P450 1B1 est exprimé constitutivement chez l'homme dans le foie et surtout dans les organes extra-hépatiques : cerveau, rein, surrénales, prostate, seins, utérus, ovaires, tissu lymphatiques, lymphocytes (Muskhelishvili *et al.*, 2001 ; Baron *et al.*, 1998). S'il n'y a pas d'expression rapportée dans un échantillon de cellules endothéliales vasculaires, le CYP1B1 est exprimé dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Zhao *et al.*, 1998), dans les cellules musculaires lisses d'artères coronaires (Dubey *et al.*, 2003), d'aortes de souris (Moorthy *et al.*, 2003) d'artères cérébrales et d'artères de méninges de rongeurs (Granberg *et al.*, 2003).

Le CYP1B1 active toutes sortes de pro-cancerogènes dont les hydrocarbures polycycliques et les amines aromatiques. Le substrat endogène est le 17-beta-oestradiol oxydé en 4-hydroxy-17-beta-oestradiol. Le CYP1B1 est responsable de la conversion des oestrogènes en catéchol (Hanna *et al.*, 2000). Ce CYP a été identifié comme gène candidat dans le glaucome congénital (Stoilov, 1997).

Le rôle de CYP1B1 dans la cascade d'oxydation de l'acide arachidonique n'est pas documenté, si ce n'est que l'acide arachidonique inhibe faiblement l'activité de CYP1B1, sans que soit examinée la nature compétitive ou non de cette inhibition (Yamazaki *et al.*, 1999). Un travail ancien (Schwartzman *et al.*, 1987) fait l'hypothèse que le 12-R-HETE (acide 12-hydroxyeicosatétraénoïque) est produit dans l'œil par un cytochrome P450, probablement CYP1B1 puisque les mutations de CYP1B sont impliquées dans le développement de l'œil et le glaucome congénital. L'expression de CYP1B1 est régulée par différents produits et dans les pathologies tumorales. CYP1B1 est surexprimé dans différents types de tumeurs (Rochat *et al.*, 2001), telles que les tumeurs du sein, du poumon, du cerveau, des testicules (Murray *et al.*, 2001) et plus particulièrement dans les tumeurs résistantes aux anticancéreux.



## **3.2. Les cytochromes P450 de la famille 2.**

Cette famille comporte de nombreux membres, dans les sous-familles 2A, 2B, 2C, 2D, 2E et 2J. Seules les sous familles 2B, 2C, 2D, 2E et 2J seraient impliquées dans la régulation du tonus vasculaire (Guengerich, 1995). C'est pourquoi nous ne décrivons que ces dernières.

### **3.2.1. Les cytochromes P450 2B.**

Cette famille comporte deux membres : CYP2B6 et CYP2B7. Le cytochrome P450 2B6 est un cytochrome P450 exprimé dans la plupart des foies humains et dans la lignée d'hépatomes humains différenciés BC2 (Gomez-Lechon *et al.*, 2001). Thum et Borlak. (2000), l'ont détecté dans les tissus cardio-vasculaires : oreillette droite, ventricule droit, artère pulmonaire, oreillette gauche, ventricule gauche et aorte et dans les cellules endothéliales d'artères humaines (Thum et Borlak, 2004). La présence d'ARNm de CYP2B6 et CYP2B7 est décrite également dans les tissus pulmonaires, les macrophages alvéolaires et la muqueuse bronchique (Raunio *et al.*, 1999 ; Macé *et al.*, 1998 ; Willey *et al.*, 1997).

Le cytochrome P450 2B6 possède une faible activité époxygénase à l'égard de l'acide arachidonique (Rifkind *et al.*, 1995) sans que les métabolites ne soient connus. L'activité du CYP2B6 peut être faiblement inhibée *in vitro* par l'acide arachidonique, ce qui pourrait signifier une inhibition compétitive de l'acide arachidonique vis-à-vis des substrats de CYP2B6 (Yamazaki *et al.*, 1999).

### **3.2.2. Les cytochromes P450 2C.**

Actuellement 4 membres de cette sous famille ont été identifiés chez l'homme : CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 et CYP2C19 (Goldstein *et al.*, 1994). Cette sous famille est localisée sur le chromosome 10 dans la région 10q24.2 (Meehan *et al.*, 1988). Des analyses par Southern Blot suggèrent qu'il existe au moins sept gènes et/ou pseudo-gènes codant cette famille de protéines (Ged *et al.*, 1988). La sous famille des cytochromes P450 2C est une des principales familles dans le foie humain mais ils ont également été localisés dans le cœur et plus spécifiquement dans le ventricule droit (Thum et Borlak, 2000), dans les macrophages

alvéolaires (Hukkanen *et al.*, 1997) et le poumon (Mace *et al.*, 1998), ils ont récemment été localisés dans les cellules musculaires lisses d'artères mammaires (Archer *et al.*, 2003).

Les cytochromes P450 2C métabolisent l'acide arachidonique en différents produits régio et stéréospécifiques, incluant les acides epoxyeicosatriénoïques (EETs) et hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs). La présence des CYP2C dans le muscle du cœur, l'aorte, le rein, le poumon, les yeux et les organes reproducteurs donne à penser que CYP2C participe à d'importants processus physiologiques et/ou pathologiques dans ces tissus (Tsao *et al.*, 2001). Les cytochromes P450 de la famille 2C avec les cytochromes P450 de la famille 4A sont sans aucun doute les cytochromes P450 les plus importants dans la régulation du tonus vasculaire. En effet, ces dernières années, de nombreuses études décrivent l'importance des CYP2C dans les fonctions vasculaires tant au niveau de la production de métabolites vaso-actifs (les EETs) qu'au niveau d'effets indirects tels que la production d'espèces réactives de l'oxygène (Fleming *et al.*, 2001) et la prolifération cellulaire (Michaelis *et al.*, 2003) notamment la prolifération des cellules musculaires lisses (Fisslthaler *et al.*, 2003).

Certaines études ne distinguent pas les cytochromes P450 2C8 et 2C9 et les nomment CYP2C8/9, cependant nous séparerons autant que possible l'étude de ces deux cytochromes qui sont proches mais distincts.

### **3.2.2.1. Le cytochrome P450 2C8.**

Ce cytochrome P450 est exprimé dans le cerveau, le foie (Kimura *et al.*, 1987), les tumeurs de la prostate, les testicules, les macrophages alvéolaires (Hukkanen *et al.*, 1997), la muqueuse bronchique (Mace *et al.*, 1998) et les artères coronaires (Bolz *et al.*, 2000).

Le cytochrome P450 2C8 métabolise le benzo[a]pyrene (Yun *et al.*, 1992), la ( R ) warfarine (Kaminsky *et al.*, 1993), le rétinol (Nadin *et al.*, 1999), un médicament anticancéreux : le paclitaxel (Rahman *et al.*, 1994), la carbamazépine, la cérvastatine, le diclofénac, l'acide rétinoïque, le rétinol, la rosiglitazone, le taxol, le triméthoprim et la zopiclone (Lewis *et al.*, 2003).

Le CYP2C8 est une époxygénase de l'acide arachidonique importante dans le foie humain (Daikh *et al.*, 1994, Zeldin *et al.*, 1996). Le CYP2C8 métabolise l'acide arachidonique en EETs dans les artères coronaires bovines et dans les artères pulmonaires de lapin (Laethem *et al.*, 1992 ; Rosolowsky *et al.*, 1990, Pinto *et al.*, 1986). Cette enzyme est présente dans le foie (Goldstein *et al.*, 1994 ; Lapple *et al.*, 2003) mais également dans les cellules

endothéliales d'artères coronaires humaines (Thum et Borlak, 2004). Les principaux EETs formés sont les 14,15-EET et le 11,12-EET (Rifkind *et al.*, 1995). Depuis peu, certaines études ont décrit les EETs comme des *Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF) (Fisslthaler *et al.*, 1999). Le cytochrome P450 2C8 serait candidat au titre d'« *EDHF synthase* » dans les cellules endothéliales humaines (Fisslthaler *et al.*, 1999, Node *et al.*, 1999, Campbell, 2000, Bolz *et al.*, 2000). Dans les artères coronaires de porc, une isozyme d'un cytochrome P450 homologue de CYP2C8/9 a été identifiée comme étant une EDHF synthase coronaire modulant l'homéostasie vasculaire par une production simultanée d'espèces réactives de l'oxygène et d'acides epoxyeicosatriénoïques.

### **3.2.2.2. Le cytochrome P450 2C9.**

Dans le foie, le CYP2C9 est le principal cytochrome P450 de la famille 2C (Goldstein *et al.*, 1994). Ce cytochrome P450 est également exprimé de façon constitutive dans le colon, le rein, le muscle, l'utérus (Kimura *et al.*, 1987 ; Zeldin *et al.*, 1995 ; Romkes *et al.*, 1991) et les artères coronaires (Fisslthaler *et al.*, 1999). CYP2C9 a été détecté dans les artères coronaires bovines et dans les artères pulmonaires de lapin (Rosolowsky *et al.*, 1990, Pinto *et al.*, 1986) et plus récemment dans les cellules endothéliales d'artères humaines (Thum et Borlak, 2004).

Le CYP2C9 est principalement responsable de l'hydroxylation du tolbutamide, mais il métabolise également la phénitoïne, l'ibuprofène, le diclofénac, la warfarine, l'acide tiénilique, le naproxen, le piroxicam et l'acide mefenamique (Lewis *et al.*, 2003), la fluvastatine (Paoletti *et al.*, 2002). Cette enzyme est également une époxygénase de l'acide arachidonique importante dans le foie humain (Daikh *et al.*, 1994, Zeldin *et al.*, 1996). Plus précisément le CYP2C9 produit les 8,9- ; 11,12- ; 14,15- EET (Daikh *et al.*, 1994).

Par l'intermédiaire de la production de métabolites vaso-actifs : les EETs, le CYP2C9 occupe une place prépondérante dans la régulation du tonus vasculaire. En effet, la production d'EETs par le CYP2C9 décrits comme des EDHF (Hoebel *et al.*, 1998 ; Fisslthaler *et al.*, 1999) provoque l'ouverture des canaux potassiques - calcium dépendants produisant une entrée de calcium dans les cellules musculaires lisses conduisant à l'hyperpolarisation de ces cellules (Fisslthaler *et al.*, 2000 ; Archer *et al.*, 2003 ; Earley *et al.*, 2003). De plus, Fleming *et*

*al.*, (2001) ont démontré que le CYP2C9 est un générateur physiologique d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules endothéliales coronaires, ce qui confère au CYP2C9 un rôle dans d'autres processus cellulaires. En effet, les espèces réactives de l'oxygène sont des molécules de transduction du signal intracellulaire impliquées dans différentes cascades de signalisation telles que la prolifération cellulaire et l'angiogénèse (Fleming *et al.*, 2001 ; Fisslthaler *et al.*, 2003). Par l'intermédiaire de la production d'EETs, le CYP2C9 joue un rôle dans la prolifération cellulaire. En effet, l'activation de la prolifération cellulaire par les EETs fait intervenir le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF) ainsi que les protéines Akt et cycline D1 impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Michaelis *et al.*, 2003). Enfin, Fisslthaler *et al.*, (2003) ont montré que certaines statines telles que la fluvastatine et la cérivastatine induisent le CYP2C9 dans les cellules endothéliales. La régulation du CYP2C9 par des médicaments à visée cardiovasculaires tels que les statines confirme donc l'importance de cette enzyme dans la régulation du tonus vasculaire.

### **3.2.2.3. Le cytochrome P450 2C18.**

Le cytochrome P450 2C18 a été cloné à partir du foie humain (Romkes *et al.*, 1991). Cependant, il semble être moins important que les CYP2C8, 2C9 et 2C19 (Goldstein *et al.*, 1994). Le cytochrome P450 2C18 contribue à l'hydroxylation de la warfarine (Goldstein *et al.*, 1994) et du lanoprazole (Pichard *et al.*, 1995). Aucune donnée n'est actuellement disponible concernant le métabolisme de composés endogènes.

### **3.2.2.4. Le cytochrome P450 2C19.**

Ce cytochrome P450 est localisé principalement dans le foie mais également dans l'intestin (Lapple *et al.*, 2003) et dans les cellules endothéliales d'artères humaines (Thum et Borlak, 2004). Cette enzyme joue un rôle important dans le métabolisme de nombreux médicaments tels que l'omeprazole, le diazepam, le proguanil et l'imipramine (Goldstein *et al.*, 1994) mais il intervient aussi dans le métabolisme de l'hexobarbital, du moclobemide, du mephobarbital, de la méphénitoïne, du propranolol et de la warfarine, de la phénytoïne et du fuconazole (Lewis *et al.*, 2003). Le CYP2C19 métabolise l'acide arachidonique en 19-HETE, 14,15-EET et 8,9-EET (Bylund *et al.*, 1998).

### 3.2.3. Le cytochrome P450 2E1.

Actuellement, il n'existe chez l'homme qu'un seul gène appartenant à cette sous famille : le CYP2E1. Ce cytochrome P450 est localisé à la position 10q24.3-qter.

CYP2E1 a été décrit dans le foie (Botto *et al.*, 1994), les lymphocytes (Song *et al.*, 1990), le poumon humain (Hukkanen *et al.*, 2002) dans les cellules endothéliales ECV304 (Hoebel *et al.*, 1998), dans les cellules de cordon ombilical : les cellules HUVEC (Farin *et al.*, 1994) et plus récemment dans les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines (Thum et Borlak, 2004).

Le CYP2E1 est impliqué dans le métabolisme des nitrosamines, du benzène et des hydrocarbures halogénés de faible poids moléculaire (Wang *et al.*, 1999). Laethem *et al.* (1993) ont étudié la métabolisation des acides laurique, stéarique, oléique, linoléique, linoléique et de l'acide arachidonique par le CYP2E1. Cette enzyme intervient dans les réactions d'hydroxylation  $\omega$ -1 et  $\omega$ -2. Les deux métabolites majeurs produits par ce cytochrome P450 sont le 19-HETE et le 18-HETE. Les autres métabolites formés de façon minoritaire sont des EETs avec principalement du 14,15- EET puis un mélange de 11,12- ; 8,9- ; 5,6- EET.

### 3.2.4. Le cytochrome P450 2J2.

Le cytochrome P450 2J2 a été localisé sur le chromosome 1 en position 1p31.3-p31.2. Le cytochrome P450 2J2 est fortement exprimé dans le cœur humain mais plus faiblement dans le foie, l'iléum, le jéjunum et le colon, et en quantité très faible dans le rein. Il n'a pas été détecté dans le cerveau humain, les ovaires ou les testicules (Wu *et al.*, 1996). Au niveau vasculaire, le cytochrome P450 2J2 est exprimé dans le poumon (Scarborough *et al.*, 1999), notamment dans les cellules épithéliales des voies aériennes, dans l'endothélium vasculaire bronchique, les cellules musculaires lisses, l'endothélium vasculaire et les macrophages alvéolaires (Zeldin *et al.*, 1996). Il est abondant dans l'endothélium des grandes et petites artères (Node *et al.*, 1999). Plus récemment, il a également été détecté dans les cellules endothéliales d'artères humaines (Thum et Borlak, 2004).

Les substrats connus du CYP2J2 sont : l'acide arachidonique, la testostérone, la benzphétamine et le diclofénac (Scarborough *et al.*, 1999). De la même façon que les autres cytochromes P450, CYP2J2 produisent trois eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique : les

acides epoxyeicosatriénoïques (EETs), les acides hydroxyeicosatétraénoïques (5- ; 8- ; 9- ; 11- ; 12- et 15- HETEs) formés par l'oxydation allylique et les acides hydroxyeicosatétraénoïques (16-, 17-, 18-, 19- et 20-HETEs) formés par l'hydroxylation  $\omega$  terminale des alcools C<sub>16</sub>-C<sub>20</sub> de l'acide arachidonique. Toutefois, les principaux métabolites formés par le CYP2J2 sont les EETs (Node *et al.*, 1999 ; Scarborough *et al.*, 1999).

### **3.3. Les cytochromes P450 de la famille 3A.**

Les cytochromes P450 de la famille 3A sont localisés sur le chromosome 7 aux positions q21-q22.1 (Brooks *et al.*, 1988). Cette famille comporte trois membres CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7 (Wrighton *et al.*, 1989).

Les cytochromes P450 de la famille 3A sont les cytochromes P450 les plus abondants dans le foie humain. Bien que le foie soit la principale localisation, les cytochromes P450 3A sont également exprimés dans les entérocytes de l'intestin grêle (Watkins, 1997), dans le rein normal et tumoral (Murray *et al.*, 1999) ainsi que dans le cerveau (Farin *et al.*, 1993). La présence de CYP3A a également été décrite dans les cellules musculaires lisses aortiques de mammifères marins (Celander *et al.*, 2000).

#### **3.3.1. Le cytochrome P450 3A4.**

Le cytochrome P450 3A4 est le cytochrome P450 le plus abondant dans le foie humain. Dans les tissus et cellules du système cardiovasculaire, les données sont contradictoires. Thum et Borlak (2000) n'ont pas observé d'expression dans les différents tissus examinés. Cependant, Ayajiki *et al.* (1999) ont rapporté une activité dans l'artère linguale de singe et Minamiyama *et al.* (1999), une expression dans l'endocarde et les coronaires ainsi que dans les vaisseaux de cœur humain. Anttila *et al.*, (1997) ont montré que le CYP3A4 était localisé dans le poumon humain, les glandes bronchiques, l'épithélium terminal et l'épithélium en colonne bronchiolaire, l'épithélium alvéolaire de type II et les macrophages alvéolaires. Plus récemment, cette enzyme a été détectée également dans les artères linguales de singe (Ayajiki *et al.*, 2003). En culture cellulaire, les cellules de veines ombilicales (HUVEC) (Farin *et al.*, 1994), les cellules endothéliales d'artères de porc (PAEC), les cellules endothéliales d'artères bovines (BAEC), les cellules endothéliales

Eahy926 et les cellules endothéliales ECV304 expriment des cytochromes P450 de la famille 3A (Hoebel *et al.*, 1998).

Le CYP3A4 métabolise environ 60% des nombreux médicaments existants sur le marché et catalyse l'hydroxylation en 6-bêta de nombreux stéroïdes incluant la testostérone, la progestérone et le cortisol.

Le CYP3A4 produit deux molécules vasodilatatrices : l'oxyde nitrique à partir du dinitrate d'isosorbide (Minamiyama *et al.*, 1999) et des acides epoxyeicosatriénoïques à partir de l'acide arachidonique (Ayajiki *et al.*, 1999 ; 2003).

### **3.3.2. Le cytochrome P450 3A5.**

Le CYP3A5 est une protéine de 52,5 kDa qui présente 85% d'homologie avec le cytochrome P450 3A4 (Aoyama *et al.*, 1989). Les CYP3A4 et CYP3A5 ont une activité analogue dans le métabolisme des stéroïdes et de la ciclosporine.

L'endothélium des vaisseaux et des capillaires pulmonaires (Anttila *et al.*, 1997 ; Raunio *et al.*, 1998) ainsi que les macrophages (Raunio *et al.*, 1998 ; Raunio *et al.*, 1999) expriment CYP3A5. Ce cytochrome P450 est également exprimé dans le poumon spécialement l'épithélium alvéolaire de type I et de type II, les cellules muqueuses et ciliées de la paroi bronchique, les glandes bronchiales, l'épithélium cuboïdal terminal et cilié bronchiolaire.

Aucune information n'est connue concernant le métabolisme de l'acide arachidonique mais compte tenu de l'homologie entre CYP3A4 et CYP3A5, on peut supposer que CYP3A5 intervient également dans la formation d'acides epoxyeicosatriénoïques.

### **3.3.3. Le cytochrome P450 3A7.**

Ce cytochrome P450 contient 13 exons (Itoh *et al.*, 1992), il présente 87% d'homologie avec le cytochrome P450 3A4 (Komori *et al.*, 1989). Le CYP3A7 est exprimé spécifiquement dans le foie fœtal mais pas dans le foie adulte (Komori *et al.*, 1990).

La seule étude dans les tissus vasculaires concerne les macrophages alvéolaires de poumon où le cytochrome P450 3A7 n'a pas été détecté (Anttila *et al.*, 1997). Aucune donnée n'est disponible concernant la production de molécules vaso-actives par l'intermédiaire de

cette enzyme. Toutefois, CYP3A7 constitue un modèle d'étude en raison de son expression dans les cellules d'hépatomes dont HepG2.

### **3.4. Les cytochromes P450 de la famille 4.**

#### **3.4.1. Le cytochrome P450 de la famille 4A.**

La sous famille CYP4A est représentée par 3 membres chez l'homme : le CYP4A9 et le CYP4A11 qui sont souvent indissociés de sorte que, seul le CYP4A11 est évoqué (Merryman *et al.*, 1997), et très récemment le CYP4A22 (Bellamine *et al.*, 2003). Les cytochromes P450 de la famille 4A sont des protéines capables d'hydroxyler la partie  $\omega$  et la partie  $\omega-1$  des acides gras insaturés (Sharma *et al.*, 1989 ; Kawashima *et al.*, 1992 ; Kawashima *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1996). Ils catalysent l' $\omega$ -hydroxylation de différentes prostaglandines (Matsubara *et al.*, 1987, Yamamoto *et al.*, 1984).

##### **3.4.1.1. Le cytochrome P450 4A9.**

Peu d'informations sont connues sur ce cytochrome P450. Le CYP4A9 est souvent assimilé au CYP4A11. Les données de la littérature indiquent que le CYP4A9 au même titre que le CYP4A11 serait impliqué dans la réaction de 12-hydroxylation de l'acide laurique (Pearce *et al.*, 1996).

##### **3.4.1.2. Le cytochrome P450 4A11.**

Le CYP4A11 a été localisé principalement dans le foie mais il est présent également dans le rein (Kawashima *et al.*, 1992 ; Kawashima *et al.*, 1994 ; Bell *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 1996) et plus précisément dans le néphron chez la souris (Stec *et al.*, 2003), les micro-vaisseaux (Imig *et al.*, 1996) notamment les micro-vaisseaux préglomérulaires (Cheng *et al.*, 2003), dans les artères cérébrales de chat (Gebremedhin *et al.*, 1998 ; Gebremedhin *et al.*, 2000), les artères pulmonaires de lapin (Birks *et al.*, 1997), les grands et petits vaisseaux, les macrophages alvéolaires et les cellules musculaires lisses isolées d'artères pulmonaires de lapin (Zhu *et al.*, 1998 ; Parmentier *et al.*, 2001), les artères mésentériques de rat (Wang *et al.*,



2001), les artères de muscle squelettique de rat (Frisbee *et al.*, 2000). Plus récemment, il a été démontré que le CYP4A est présent dans les cellules endothéliales et musculaires lisses d'artères pulmonaires de rat, dans les cellules épithéliales et musculaires lisses bronchiques et dans les macrophages de poumon de rat (Zhu *et al.*, 2002 ; Yu *et al.*, 2002) alors que Jiang *et al.*, (2004) ont décrit CYP4A comme étant présent spécifiquement dans les cellules musculaires lisses.

Le CYP4A11 catalyse l' $\omega$ -hydroxylation des acides laurique, palmitique et arachidonique mais n'hydroxyle pas les prostaglandines. C'est la seule enzyme avec CYP4F2 qui catalyse l' $\omega$ -hydroxylation des acides gras dans le foie (Kawashima *et al.*, 1992 ; Kawashima *et al.*, 1994) et le rein (Bell *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 1996). Ces données proviennent d'études chez le rat qui n'ont actuellement pas été confirmées chez l'homme. Le CYP4A intervient dans la régulation du tonus vasculaire par l'intermédiaire de la production du 20-HETE (Powell *et al.*, 1998). En effet, ce dernier est responsable de l'inhibition des canaux  $K^+$  activés par le calcium dans les cellules musculaires lisses (Gebremedhin *et al.*, 1998). De plus, l'absence de *cyp4a14* provoque une hypertension chez la souris, preuve de l'importance de cette enzyme dans le contrôle de la pression sanguine. Cette étude suggère que les homologues de CYP4A chez l'homme pourraient également être impliqués dans l'hypertension humaine tant au niveau génétique que moléculaire (Holla *et al.*, 2001). En effet, une étude plus récente démontre le rôle de CYP4A dans la régulation de la fonction rénale et de la pression sanguine chez l'homme (Capdevila *et al.*, 2003).

### **3.4.2. Les cytochromes P450 de la famille 4F.**

Cette sous famille comporte chez l'homme 5 protéines : CYP4F2, CYP4F3 (Kikuta *et al.*, 1993, Nelson *et al.*, 1993), CYP4F8 (Bylund *et al.*, 2000), CYP4F11 (Cui *et al.*, 2000) et CYP4F12 (Bylund *et al.*, 2001). Ces cytochromes P450 sont tous localisés sur le chromosome 19p13.1. La plupart des produits de métabolisme obtenus sont des eicosanoïdes incluant les leucotriènes, les prostaglandines, les lipoxines et les HETEs. Ces eicosanoïdes jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire notamment dans l'attraction des leucocytes, la régulation du tonus dans les vaisseaux sanguins et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Rocha *et al.*, 2003). Les membres de la famille 4F réalisent l' $\omega$ -hydroxylation du leucotriène  $\beta_4$  (LTB<sub>4</sub>) pour produire du 20-hydroxy-LTB<sub>4</sub> (20-OH-LTB<sub>4</sub>) (figure 4).

### **3.4.2.1. Le cytochrome P450 4F2.**

Le cytochrome P450 4F2 a été isolé à partir de foie humain et présente une activité d' $\omega$ -hydroxylation de l'acide arachidonique (Zhang *et al.*, 2000a ; Zhang *et al.*, 2000b). Ce cytochrome P450 est également appelé leucotriène B4 (LTB4)  $\omega$ -hydroxylase à cause de son activité catalytique vis-à-vis du LTB4 (Kikuta *et al.*, 1999 ; Cui *et al.*, 2000).

Le CYP4F2 est une des principales enzymes, avec le CYP4A11, responsable de la formation du 20-HETE à partir de l'acide arachidonique (Powell *et al.*, 1998).

### **3.4.2.2. Le cytochrome P450 4F3.**

Ce cytochrome P450 a été cloné dans les neutrophiles. Comme le CYP4F2, il est également appelé LTB4  $\omega$ -hydroxylase car il réalise l'inactivation de LTB4 par l' $\omega$ -oxydation du carbone terminal pour former le 20-OH-LTB4 et le 20-COOH LTB4. Il existe deux isoformes de CYP4F3 : CYP4F3A présent dans les neutrophiles et CYP4F3B présent dans le foie fœtal (Christmas *et al.*, 1999). En plus de LTB4, le CYP4F3 réalise l'hydroxylation de la lipoxine A4, la lipoxine B4, le 5-HETE et le 12-HETE.

### **3.4.2.3. Le cytochrome P450 4F8.**

Le cytochrome P450 4F8 possède des séquences similaires aux CYP4F2 (81.2%) et CYP4F3 (76.7%). Le cytochrome P450 4F8 a été détecté dans les glandes de la prostate et dans les vésicules séminales (Bylund *et al.*, 1999) mais pas dans les leucocytes.

Ce cytochrome P450 est impliqué dans le métabolisme de l'acide arachidonique (Bylund *et al.*, 1999) mais également des prostaglandines produites à partir de l'acide arachidonique (figure 4), en effet, CYP4F8 métabolise les prostaglandines H<sub>1</sub> (PGH<sub>1</sub>) et H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) en 19-hydroxy-PGH<sub>1</sub> et 19-hydroxy-PGH<sub>2</sub> (Bylund *et al.*, 2000), le cytochrome P450 4F8 peut alors être également nommé PGH 19-hydroxylase.

#### **3.4.2.4. Le cytochrome P450 4F11.**

Des analyses par Northern Blot ont montré que le CYP4F11 est exprimé à un fort taux dans le foie et le rein et à un taux faible dans le cœur, les muscles squelettiques et le placenta, il n'est pas présent dans les leucocytes ou les autres tissus (Cui *et al.*, 2000).

Lasker *et al.*, (2000) ont fait l'hypothèse que le CYP4F11 était responsable de la formation de 20-HETE dans le rein humain, CYP4F11 pourrait donc réguler les fonctions vasculaires et tubulaires rénales.

#### **3.4.2.5. Le cytochrome P450 4F12.**

Le CYP4F12 a été détecté dans le foie, le rein, le colon, l'intestin grêle et le cœur (Bylund *et al.*, 2001). Ce cytochrome ne métabolise pas seulement des substrats endogènes mais serait également impliqué dans l'hydroxylation de l'ébastine (Hashizume *et al.*, 2002).

Ce cytochrome P450 4F12 est responsable de l' $\omega$ -hydroxylation du LTB<sub>4</sub> et de l'acide arachidonique cependant, ses activités sont plus faibles que celles du CYP4F2. Le CYP4F12 métabolise l'acide arachidonique en un métabolite majeur : le 18-HETE (Bylund *et al.*, 2001). Il est également impliqué dans la production de différentes prostaglandines telles que PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  et PGH<sub>2</sub> (Bylund *et al.*, 2001).

### **3.5. Les cytochromes P450 5A1.**

Le cytochrome P450 5A1 appelé également thromboxane synthase est le seul membre de la famille 5. Le CYP5A1 a été détecté dans le rein (Endoh *et al.*, 1997), dans les cellules épithéliales bronchiques, les cellules musculaires lisses bronchiques, le septum et les macrophages alvéolaires (Ermert *et al.*, 2000).

Cette enzyme catalyse la conversion de l'endoperoxyde de la prostaglandine endoperoxyde en thromboxane A<sub>2</sub>, un vasoconstricteur potentiel et un inducteur de l'agrégation plaquettaire. En association avec la prostacycline, le thromboxane A<sub>2</sub> joue un rôle clé dans la maintenance de l'homéostasie vasculaire.

### 3.6. Le cytochrome P450 8A1.

Le cytochrome P450 8A1 appelé prostacycline synthase est le seul membre de la famille 8 parmi les cytochromes P450 humains. Il est situé sur le chromosome 20 à la position q13.

Cette enzyme a été détectée dans le cerveau humain (Siegle *et al.*, 2000) et dans les cellules aortiques endothéliales (Miyata *et al.*, 1994).

Le cytochrome P450 8A1 n'a pas d'activité monooxygénase. Il catalyse la conversion de la prostaglandine H2 (PGH2) en prostacycline (PGI2), vasodilatateur inhibant la croissance des cellules musculaires lisses, c'est un inhibiteur potentiel de l'agrégation plaquettaire (Moncada *et al.*, 1978, Needleman *et al.*, 1986). Il peut également réarranger PGH<sub>2</sub> en thromboxane A<sub>2</sub>.

La plupart de ces cytochromes décrits ci-dessus sont impliqués dans le métabolisme de l'acide arachidonique et de cette façon dans la production de molécules vasodilatatrices telles que les EETs ou le NO et des molécules vasoconstrictrices telles que les HETEs. Les cytochromes P450 vasculaires qui semblent avoir un rôle très important dans la régulation du tonus vasculaire sont les cytochromes de la famille 2C, le CYP2E1, le CYP2J2, le CYP4A11 et les cytochromes de la famille 4F.

Plusieurs cytochromes P450 sont localisés dans les tissus vasculaires et impliqués dans le métabolisme de l'acide arachidonique et par conséquent dans la production de composés vaso-actifs. Parmi les cytochromes P450 jouant un rôle important dans le tonus vasculaire, on peut citer les cytochromes P450 de la famille 2C, le cytochrome 2J2 et les cytochromes P450 de la famille 4A. Les cytochromes P450 de la famille 3A ont un rôle moins important au niveau vasculaire.

Cytochrome P450	Localisation vasculaire	Métabolites vaso-actifs
CYP1B1	Cellules musculaires lisses	12-(R)-HETE
CYP2C8	macrophages alvéolaires, muqueuse bronchique, artères coronaires	11,12- ; 14,15- EET
CYP2C9	cœur, artères coronaires	8,9- ; 11, 12- ; 14,15-EET
CYP2C18	cœur	
CYP2C19	codeur	8,9- ; 14, 15-EET ; 19-HETE
CYP2E1	poumon, cellules endothéliales	14, 15-EET ; 18- ; 19-HETE
CYP2J2	cœur, artères	5,6- ; 8,9- ; 11,12- ; 14,15-EET
CYP3A4	cœur, artères, poumon, cellules endothéliales	EETs, NO
CYP3A5	poumon, endothélium des vaisseaux	NO
CYP3A7		NO
CYP4A9/11	rein	20-HETE
CYP4F2	rein	20-HETE, 20-OH-LTB4
CYP4F3		20-OH-LTB4, 5-HETE, 12- HETE
CYP4F8		Prostaglandines
CYP4F11	rein, cœur	20-HETE
CYP4F12	rein, cœur	18-HETE, prostaglandines
CYP5A1	rein, cellules musculaires lisses bronchiques, macrophages alvéolaires	TXA2
CYP8A1	cellules aortiques endothéliales	prostacycline.

*Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents cytochromes P450 vasculaires, leur localisation dans les organes vasculaires et les métabolites vaso-actifs qu'ils forment.*

## **II. Le tonus vasculaire.**

### **1. Définition.**

La vaso-motricité est la propriété qu'ont les vaisseaux de faire varier leur calibre par le jeu des éléments musculaires contenus dans leur paroi notamment grâce à de nombreuses fibres musculaires. Claude Bernard en 1851 a découvert le tonus vaso-moteur et son origine.

On désigne par tonus vasculaire (ou tonus-vasomoteur) un état de demi-contraction permanente dans lequel se trouvent maintenues les fibres musculaires lisses de la paroi des artères et des artérioles.

### **2. Contrôle du tonus vasculaire.**

L'endothélium participe au catabolisme des amines vasopressives et à la transformation de l'angiotensine II par l'enzyme de conversion. L'angiotensine II possède un récepteur sur les cellules musculaires lisses qui exerce une action vasoconstrictive contrôlée dans l'endothélium normal.

L'endothélium vasculaire synthétise et libère des composés qui sont impliqués dans la régulation du tonus vasculaire (Furchgott et Vanhoutte, 1989). Ces dérivés endothéliaux vaso-actifs incluant la prostacycline sont : le facteur relaxant dérivé de l'endothélium ou *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) ou NO, le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ou *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF), l'endothéline et les HETEs. Ces facteurs endothéliaux sont responsables d'effets vaso-actifs de nombreuses molécules incluant l'acétylcholine, la bradykinine et l'ATP. L'altération de la production des composés vaso-actifs peut être associée avec des maladies cardiovasculaires, telles que l'athérosclérose, les vasospasmes coronaires et l'hypertension (Furchgott et Vanhoutte, 1989) (figure 7).

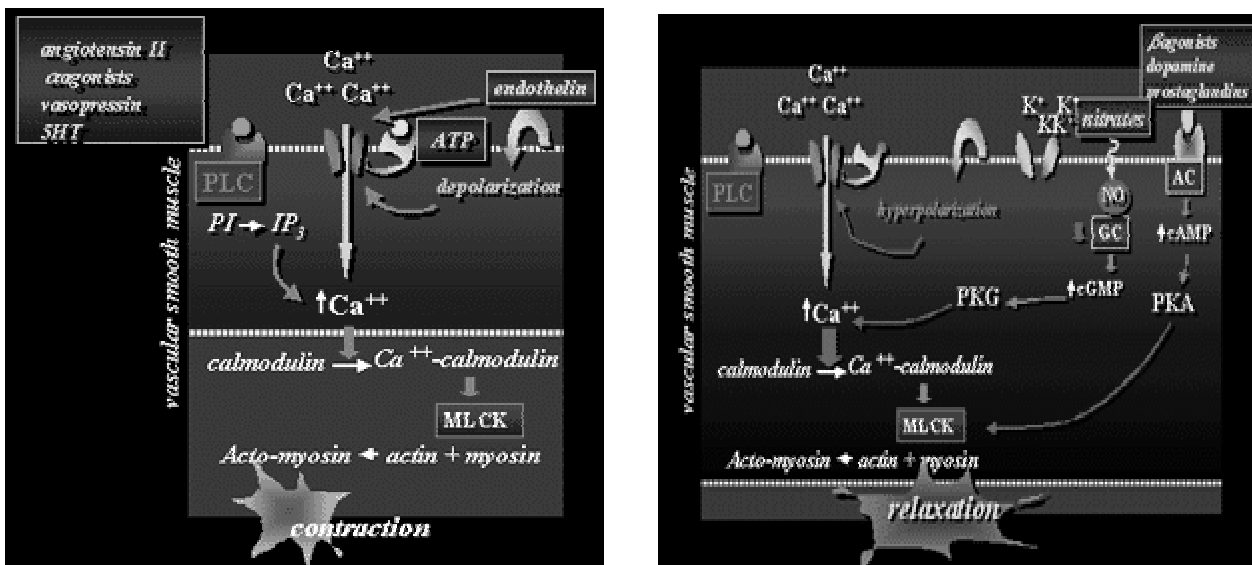
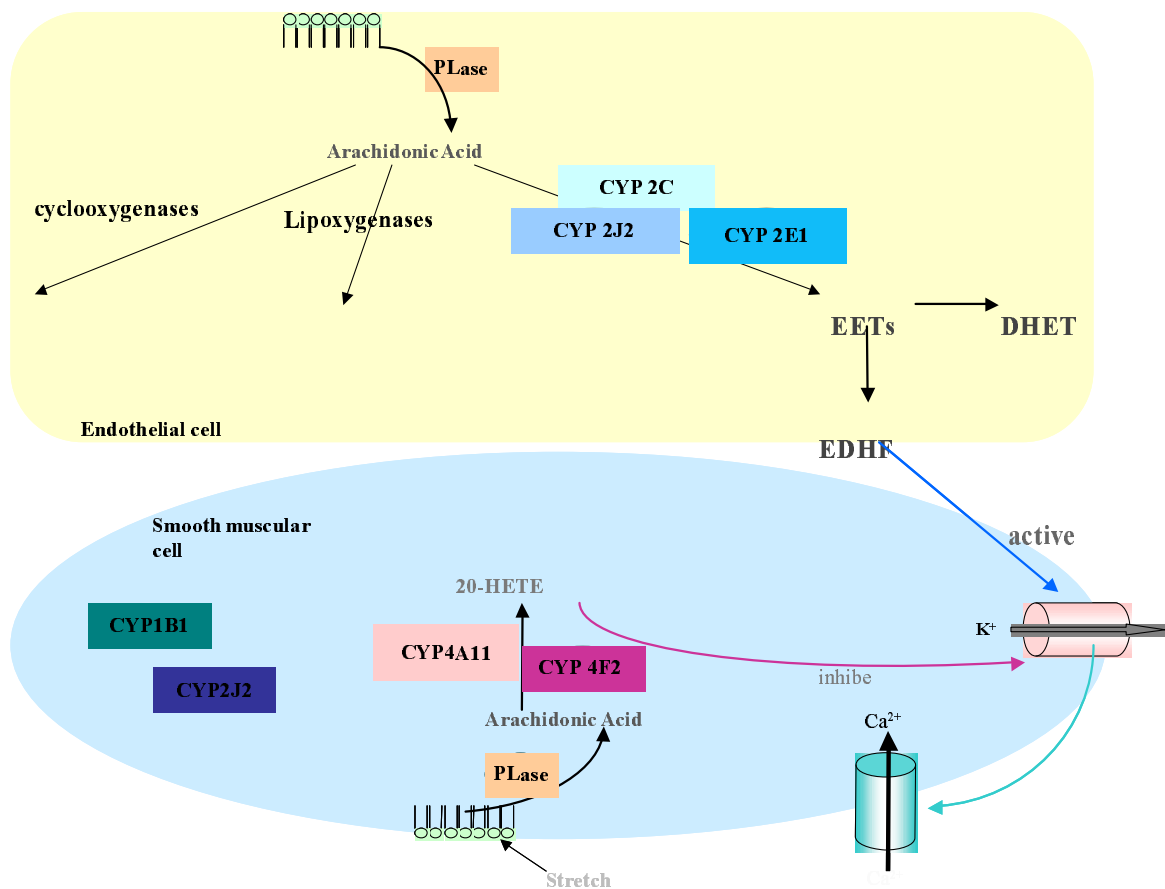


Figure 7 : Mécanismes de contraction et de relaxation.

Le stress membranaire, un certain nombre d'hormones vaso-actives et de mitogènes activent la phospholipase C ce qui augmente la synthèse d'inositol 3 phosphate (IP<sub>3</sub>) provoquant la libération de calcium (Ca<sup>2+</sup>) intracellulaire. L'élévation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> active les canaux K<sub>Ca</sub> suivi d'une hyperpolarisation de la membrane qui empêche la contraction vasculaire en limitant l'influx de Ca<sup>2+</sup> à travers les canaux calciques voltage dépendants (Gebremedhin *et al.*, 1998).

Le 20-HETE joue un rôle important puisque l'augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire est connue pour activer la phospholipase A sensible au Ca<sup>2+</sup> et la diacylglycerol lipase qui libèrent l'acide arachidonique. Ce dernier est converti par les cytochromes P450 en 20-HETE qui bloque les canaux K<sub>Ca</sub>. Ce blocage dépolarise les cellules musculaires lisses et provoque l'entrée de Ca<sup>2+</sup> puis la contraction par l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (Gebremedhin *et al.*, 1998).

Les acides epoxyeicosatriénoïques (EETs) sont produits par les cytochromes P450 à partir de l'acide arachidonique dans l'endothélium et sont des vasodilatateurs potentiels qui hyperpolarisent les cellules musculaires lisses en augmentant l'activité des canaux K<sub>Ca</sub>. L'acétylcholine et la bradykinine stimulent la libération d'EETs à partir de l'endothélium, ces EETs servent donc de facteur hyperpolarisants dérivés de l'endothélium dans certains systèmes vasculaires (Graier *et al.*, 1999) (figure 8).



**Figure 8 :** Métabolisme de l'acide arachidonique par les enzymes vasoactives. Rôle des métabolites des cytochromes P450, les EETs et HETEs (d'après Campbell et al., 1999 ; Roman et al., 2000).

### 3. Facteurs impliqués dans le tonus vasomoteur.

#### 3.1. Facteurs vasoconstricteurs.

##### 3.1.1. L'acide 20 hydroxyeicosatetraenoïque (le 20-HETE).

La formation du 20-HETE nécessite l'hydroxylation de l'acide arachidonique à la première liaison carbone-hydrogène catalysée par les cytochromes P450 appartenant à la famille 4. Le 20-HETE est produit par les cellules musculaires lisses des vaisseaux rénaux et cérébraux mais sa synthèse n'a pas été démontrée dans les artères coronaires (Campbell and Harder., 1999). Chez l'homme, l' $\omega$ -hydroxylation de l'acide arachidonique en 20-HETE est réalisée par le CYP4F2, un autre membre de la famille 4. Quant au CYP4A11, il serait



également impliqué dans la production du 20-HETE, le CYP4F2 réalisant la majeure partie de la réaction.

Le 20-HETE a des effets potentiels sur le transport rénal des ions, le tonus vasculaire et la prolifération cellulaire (Lasker *et al.*, 2000). Une étude plus récente a décrit le rôle du 20-HETE dans l'angiogénèse et la densité des vaisseaux (Amaral *et al.*, 2003). Ce composé est un constricteur potentiel des vaisseaux rénaux et extra-rénaux, une propriété qui a été attribuée à la capacité des eicosanoïdes à inhiber l'ouverture des canaux  $K^+$  activés par le  $Ca^{2+}$  à large conductance dans les cellules musculaires lisses vasculaires.

Le 20-HETE est le principal métabolite formé par les cytochromes P450 monooxygénases dans le rein chez le rat, l'homme et le lapin (Escalante *et al.*, 1993). Harder *et al.* (1997) ont montré que le NO (oxyde nitrique) régule la formation du 20-HETE. Le NO se lie et inactive le groupement hème du cytochrome P450 provoquant ainsi un système de rétrocontrôle négatif. Ceci suggère que le 20-HETE peut agir comme un second messager cellulaire et joue un rôle important dans le processus de transduction du signal intervenant dans le développement du tonus musculaire dépendant de la pression. L'inhibition du 20-HETE contribue à l'activation des canaux  $K^+$  et aux effets vasodilatateurs du NO dans la microcirculation rénale (Sun *et al.*, 1998). Il a été démontré que le 20-HETE augmente les activités de MAPK et de cPLA2, ce qui provoque la translocation de Ras. L'activation de Ras/MAPK par le 20-HETE amplifie l'activité de cPLA2 et libère de l'acide arachidonique par un mécanisme de rétrocontrôle négatif. Ce mécanisme d'activation de Ras/MAPK par le 20-HETE peut jouer un rôle central dans la régulation d'autres molécules de signalisation intracellulaire impliquées dans la prolifération et la croissance cellulaire (Muthalif *et al.*, 1998).

### **3.1.2. Les endothélines.**

L'endothéline 1 (ET-1) est l'isopeptide endothéline prédominant généré par les cellules endothéliales, plus précisément dans la paroi vasculaire, il apparaît donc comme le peptide le plus important impliqué dans les événements cardiovasculaires. De nombreuses conditions pathologiques sont associées avec l'élévation de l'ET-1 dans les parois des vaisseaux sanguins. Sous l'influence de médiateurs pro-inflammatoires, les cellules musculaires lisses peuvent devenir un site important de production d'ET-1 (Woods *et al.*,

1998 ; Woods *et al.*, 1999). L'augmentation d'ET-1 dans les veines saphènes variqueuses stimule la prolifération des cellules musculaires lisses ce qui provoque des altérations morphologiques des parois des veines variqueuses. Cette augmentation d'ET-1 produit également une veino-constriction ce qui permet de contrecarrer la relaxation de la paroi des veines chez des patients variqueux (Mangiafico *et al.*, 1997).

A cause de l'implication de ET-1 dans les désordres vasculaires tels que l'hypertension et l'athérosclérose, Delerive *et al.* (1999) se sont intéressés à la régulation de l'expression de l'ET-1 par les activateurs de PPAR. Leurs résultats indiquent que PPAR $\alpha$  et PPAR $\beta$  sont exprimés dans les cellules endothéliales humaines vasculaires et que les activateurs de PPAR inhibent la biosynthèse de ET-1 induite par la thrombine, indiquant un nouveau rôle pour les PPAR dans la fonction vasculaire endothéliale.

### **3.1.3. Les prostaglandines.**

Les prostaglandines sont des molécules vasoconstrictrices mais peuvent parfois avoir un rôle vasodilatateur. Les prostaglandines sont produites par les cyclooxygénases à partir de l'acide arachidonique (figure 4). La synthèse des prostaglandines peut être stimulée par des agents chimiques et physiques variés dans les cellules endothéliales vasculaires incluant le stress mécanique, l'hypoxie, les acides gras estérifiés provenant de la membrane cellulaire, les ionophores de calcium, la bradykinine, la thrombine, l'angiotensine II et les facteurs de croissance (Weksler *et al.*, 1982).

## **3.2. Facteurs vasodilatateurs.**

### **3.2.1. Facteur Endothélial Hyperpolarisant, *Endothelium Derived Hyperpolarising Factor* ou EDHF.**

L'acétylcholine au contact de l'endothélium induit une hyperpolarisation de la membrane des cellules musculaires lisses sous-jacentes dépendante de l'endothélium qui produit une substance diffusant vers le muscle lisse. Dans la plupart des cas, le NO ne modifie pas le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses et ne peut donc pas être responsable de cette hyperpolarisation membranaire. L'hypothèse de l'existence d'un autre agent : l'EDHF a donc été émise. Ce dernier semble agir sur le muscle lisse en ouvrant les

canaux potassiques. La contribution de l'EDHF aux relaxations dépendantes de l'endothélium varie selon le lit vasculaire et selon la taille des vaisseaux étudiés (Lévy *et al.*, 1996).

L'origine de ce composé hyperpolarisant est discutée depuis de nombreuses années. L'emploi d'inhibiteurs plus ou moins spécifiques des cytochromes P450 a permis de supposer que ces enzymes intervenaient dans la production de ce composé (Fissthaler *et al.*, 1999). Si depuis longtemps, on soupçonnait l'implication des cytochromes P450 dans la production de ce facteur issu de l'acide arachidonique, aucune preuve directe n'existait. L'utilisation d'ARN anti-sens a permis de démontrer spécifiquement le rôle du cytochrome P450 2C dans la production de l'EDHF dans les artères coronariennes (Fisslthaler *et al.*, 1999). Le composé produit et candidat au titre d'EDHF est un acide epoxyeicosatriénoïque (EET).

Dans la mesure où chez le rat, CYP2C11, orthologue de CYP2C8 chez l'homme, est fortement réprimé par les mécanismes inflammatoires, on peut supposer que ces mécanismes régulent l'expression des CYP2C chez l'homme. Cette régulation limiterait ainsi la vasomotricité des vaisseaux coronariens et jouerait un rôle dans l'installation des pathologies cardiaques. Parallèlement, d'autres travaux ont suggéré que d'autres cytochromes P450 seraient impliqués dans la production d'EDHF coronarien ou rénal : le CYP2J2 pour les coronaires, le CYP4A11 et le CYP4F2 pour le rein (Node *et al.*, 1999, Lasker *et al.*, 2000).

Certains auteurs (Bauersachs *et al.*, 1996 ; Nishikawa *et al.*, 2000) ont supposé que le NO inhibe la production et/ou l'action de l'EDHF dans la microcirculation coronaire chez l'homme. Dans cette étude, ces auteurs supposent que lorsque la production de NO est inhibée, l'inhibition exercée par rétrocontrôle sur la production ou l'action de l'EDHF serait levée ce qui permettrait de maintenir, au moins en partie, une fonction vasodilatatrice endothéliale.

Les médiateurs pro-inflammatoires inhibent la formation de l'EDHF dans les artères isolées. Ainsi une diminution de la formation d'EDHF peut contribuer au dysfonctionnement endothélial dans l'artériosclérose (Kessler *et al.*, 1999). Dans les artères coronaires de porc, une isozyme homologue du cytochrome P450 2C8/9 a été identifiée comme une EDHF synthase. Comme certains cytochromes ont été décrits comme produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), les auteurs supposent que l'EDHF synthase coronaire peut moduler l'homéostasie vasculaire par la production simultanée de ROS et d'acides epoxyeicosatriénoïques. L'isozyme du CYP2C8/9 serait un générateur physiologique de ROS dans les cellules endothéliales coronaires et modulerait à la fois le tonus et l'homéostasie (Fleming *et al.*, 2001).

### 3.2.2. L'oxyde nitrique : le NO.

L'oxyde nitrique est produit dans les cellules endothéliales à partir de la L-arginine par la NO synthase endothéliale. Il peut également être produit à partir du dinitrate d'isosorbide par le CYP3A4 (Minamiyama *et al.*, 1999).

Le NO est le principal facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF : *Endothelium Derived Relaxing Factor*). Il relaxe les cellules musculaires lisses par la stimulation de la guanylate cyclase, l'accumulation du GMPc et les modifications de certains processus intracellulaires dépendants du GMPc, incluant l'activation des canaux potassiques à travers la protéine kinase dépendante du GMPc (Bolotina *et al.*, 1994).

Le stress mécanique exercé sur l'endothélium par le flux sanguin représente le stimulus majeur pour la production continue de NO (Lamontagne *et al.*, 1992), c'est un système hautement efficace et sensible pour neutraliser la contraction induite de façon myogénique et neurogénique. Toute vasoconstriction dans les vaisseaux perfusés augmente le stress mécanique agissant sur les cellules endothéliales qui répondent en augmentant la production de NO et ainsi atténuent la vasoconstriction (Fleming *et al.*, 1999). La modulation de la constriction myogénique par le NO est plus prononcée dans les grandes artères que dans les petites.

Le NO produit en réponse à une contraction myogénique, antagonise de façon fonctionnelle le 20-HETE en activant les canaux  $K^+_{Ca}$  à large conductance (Archer *et al.*, 1994, Bolotina *et al.*, 1994, Mistry et Garland., 1998). De plus, le NO pourrait moduler la formation du 20-HETE en se liant et en inactivant le groupement hémique du cytochrome P450 de la même façon qu'il inhibe l'EDHF synthase (Bauersachs *et al.*, 1996).

Il a été supposé que la probabilité d'ouverture des canaux  $K^+_{Ca}$  à large conductance dans les segments artériels est déterminée par la balance de la production vasculaire entre le 20-HETE et le NO/EDHF et que le NO et l'EDHF affectent le tonus vasculaire par interaction avec les canaux  $K^+_{Ca}$  induite par le 20-HETE (Fleming *et al.*, 1999). Le NO est également capable d'influencer la production d'autres composés. Par exemple, le NO augmente la synthèse de prostacycline à la fois *in vitro* (Davidge *et al.*, 1995) et *in vivo* (Sautebin *et al.*, 1995) en activant la prostaglandine H synthase (Davidge *et al.*, 1995) et/ou l'activité de la

cyclooxygénase (Salvemini *et al.*, 1993) via un mécanisme indépendant de la GMP cyclique. Comme précisé précédemment, l'EDHF n'est pas libéré lorsque le NO se trouve dans les concentrations physiologiques (Bauersachs *et al.*, 1996).

Le NO inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires par des changements spécifiques de l'expression et de l'activité des protéines régulatrices du cycle cellulaire indépendamment du GMPc. La surexpression adénovirale de NO Synthase endothéliale représente une stratégie cytostatique pour la thérapie génique des maladies vasculaires (Tanner *et al.*, 2000).

### **3.2.3. Les acides epoxyeicosatriénoïques : les EETs.**

Les EETs sont produits par les cellules endothéliales rénales (Alonso-Galicia *et al.*, 1998 ; Harder *et al.*, 1996), cérébrales (Harder *et al.*, 1994 ; Harder *et al.*, 1998), pulmonaires (Zhu *et al.*, 2000) et coronaires (Campbell *et al.*, 1996). Ces données sont basées sur le fait que les cellules endothéliales expriment les cytochromes P450 des familles 1A, 2B, 2C et 2J (Fisslthaler *et al.*, 2000 ; Fisslthaler *et al.*, 1999 ; Hoebel *et al.*, 1998 ; Lin *et al.*, 1996 ; Node *et al.*, 1999). Une seule étude de la littérature décrit la production d'EETs par les cellules musculaires lisses (Hasunuma *et al.*, 1991). Une enzyme de la famille de CYP2C : CYP2C8/9 a été décrit comme la première source d'EETs dans les artères coronaires humaines (Fisslthaler *et al.*, 1999 ; Fisslthaler *et al.*, 2000).

Les autres epoxygénases exprimées dans les cellules endothéliales tels que CYP1A, CYP2B, CYP2C et CYP2J, ne jouent qu'un rôle mineur dans la production d'EETs dans les conditions normales. Toutefois, l'expression de ces autres isoformes est induite par les hydrocarbures, les anesthésiques, les antibiotiques, les hormones ou l'alimentation. Ces cytochromes P450 peuvent donc jouer un rôle plus important suite à une modification de leur expression par ces différentes molécules. En effet, dans certaines circonstances pathologiques, l'endothélium peut être exposé à de relativement grandes quantités d'EETs, c'est le cas notamment dans l'hypertension (Pomposiello *et al.*, 2001 ; Omata *et al.*, 1992) et dans l'hypercholestérolémie (Pfister *et al.*, 1991), ceci pourrait être dû à l'augmentation de l'expression des isoformes mineures.

Les EETs hyperpolarisent les cellules musculaires lisses en augmentant l'ouverture des canaux  $K_{Ca}$  (Graier *et al.*, 1999). Les EETs nécessitent un signal de transduction intracellulaire afin d'augmenter l'activité des canaux  $K^+$ . En présence de GTP qui dissocie les

sous unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  des protéines G, les EETs activent les canaux  $K_{Ca}$  dans les cellules musculaires lisses d'artères coronaires humaines (Fukao *et al.*, 2001 ; Li et Campbell, 1997).

En plus de la régulation du tonus vasculaire, les EETs ont des propriétés anti-inflammatoires en empêchant l'adhésion des leucocytes activés aux parois vasculaires (Node *et al.*, 1999). Des concentrations de l'ordre du nanomolaire de 11,12- EET ou la surexpression de CYP2J2 empêche la régulation positive de l'expression des molécules d'adhésion cellulaires vasculaire -1 (VCAM-1) et de la E-selectine dans des cellules endothéliales en culture en réponse à différentes cytokines (*tumor necrosis factor*, interleukine  $1\alpha$ ) et au lipopolysaccharide (Fleming *et al.*, 2001 ; Node *et al.*, 1999). En outre, les EETs activent les signaux de transduction tyrosine kinase et MAP kinase dans les cellules endothéliales (Fleming *et al.*, 2001 ; Graier *et al.*, 1999 ; Mombouli *et al.*, 1999) et musculaires lisses (Fleming *et al.*, 1999 ; Mombouli *et al.*, 1999), ce qui peut activer différents signaux de transduction conduisant par exemple à la production de facteurs de croissance cellulaire.

Fitzpatrick *et al.*, (1986) ont montré que les EETs inhibent l'agrégation plaquettaire induite par l'acide arachidonique et les dommages vasculaires. Certains isomères des EETs inhibent l'agrégation plaquettaire par compétition avec l'acide arachidonique en inhibant la formation de thromboxane (Fitzpatrick *et al.*, 1986).

Les EETs sont également des mitogènes potentiels et contribuent aux effets des facteurs de croissance dans les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires. Les effets mitogéniques des EETs sont associés à d'une part une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et d'autre part à une augmentation du pH intracellulaire, l'activation des cascades de transduction du signal de la tyrosine kinase et de la MAP kinase (Chen *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 1999). Les EETs peuvent également être des mitogènes dans le système vasculaire et jouer un rôle dans l'angiogénèse et les dommages vasculaires (Munzenmaier et Harder, 2000).

#### **3.2.4. La prostacycline.**

Les cellules endothéliales sont le site majeur de production de la prostacycline qui induit une relaxation du muscle lisse vasculaire par activation de l'adényl cyclase et une augmentation de la production d'un nucléotide, la 3',5' adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Levy *et al.*, 1996).

#### 4. Régulation du tonus vasculaire.

Le tonus vasculaire est régulé par de nombreux facteurs aussi bien mécaniques que chimiques. Dans cette partie, nous allons tenter de décrire succinctement leur effets sur le tonus vasculaire.

De nombreux facteurs interviennent dans la régulation du tonus vasculaire. En effet, toute modification de l'expression des différentes molécules vaso-actives telles que les EETs, le NO, les prostaglandines ou les HETEs peut avoir des répercussions sur l'homéostasie vasculaire. Ainsi, dans les conditions hypoxiques observées lors de la stase sanguine, une augmentation de la production de prostacyline (Martin *et al.*, 1992) et du taux d'EETs (Dinunno *et al.*, 2003 ; Earley *et al.*, 2003) ainsi qu'une diminution des facteurs vasoconstricteurs tels que le 20-HETE (Zhu *et al.*, 2000) ont été observés. Par contre, Schmedje *et al.* (1997) ont montré que l'hypoxie inhibe la libération de NO et augmente la libération d'ET-1 par les cellules endothéliales *in vitro*.

Le stress mécanique exercé sur les parois vasculaires entraîne également une régulation des substances vaso-actives telles que les EETs, les HETEs, le NO, les prostaglandines et l'endothéline et régule la perméabilité macromoléculaire et l'endocytose (Ando et Kamiya, 1993 ; Korenaga *et al.*, 1997). En présence de stress mécanique, l'expression et l'activité de *l'endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase* (Fisslthaler *et al.*, 2001), l'activité du NO (Paniagua *et al.*, 2001) ainsi que la synthèse d'endothéline-1 (Masatsugu *et al.*, 2003) sont diminués. Aucune étude n'est actuellement disponible concernant la régulation du 20-HETE par le stress mécanique.

Les phénomènes inflammatoires accompagnant généralement les pathologies cardiovasculaires (Lind 2003 ; Ridker *et al.*, 2003 ; Gonzalez et Selwyn, 2003) sont également régulateurs du tonus vasculaire. En effet, il a été démontré que le TNF- $\alpha$  et le LPS inhibent l'expression de la NO synthase endothéliale (Muzaffar *et al.*, 2003). La cyclooxygénase de type 2 productrice des prostaglandines est également régulée par différentes cytokines pro-inflammatoires (Vane *et al.*, 1998). De plus, il a été démontré que les EETs possédaient des propriétés inflammatoires (Node *et al.*, 1999).

Ces différentes études nous montrent que le tonus vasculaire et plus particulièrement la production de molécules vasodilatatrices sont modulés par différents facteurs, ce qui peut conduire à plus long terme au développement de pathologies vasculaires.

Tous ces facteurs modulent donc de façon plus ou moins importante le tonus vasculaire. Ces modifications du tonus vasculaire peuvent conduire à de simples modifications physiologiques mais peuvent également contribuer à certaines pathologies telles que l'hypertension artérielle ou la pathologie variqueuse. Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à la pathologie variqueuse et aux modifications physiologiques qu'elle entraîne ce qui fera l'objet de notre troisième partie.



### **III. La pathologie variqueuse.**

#### **1. Les veines.**

Le terme veine désigne les vaisseaux qui ramènent le sang veineux chargé de gaz carbonique et de déchets de dégradation issus du fonctionnement cellulaire au cœur. Leurs parois sont beaucoup plus élastiques et souples que les artères, elles peuvent donc se dilater de façon importante. La circulation veineuse est assurée par deux réseaux de veines : l'un superficiel, l'autre profond, ils communiquent entre eux par les veines dites perforantes. Les veines superficielles collectent le sang des tissus superficiels des membres et le conduisent dans les veines profondes. Ainsi, aux membres inférieurs, les veines saphènes (superficielles) se terminent à la partie supérieure de la cuisse en se jetant dans les veines fémorales (profondes).

Dans les jambes, le réseau de veines profondes draine 90% du retour veineux. Il est composé de la veine poplitée, de la veine fémorale et du confluent ilio-cave. Le réseau de veines superficielles, parfois visibles sous la peau où elles apparaissent sous forme de filets bleuâtres, draine les 10% restant. Il est constitué de la grande et de la petite saphène. Ces deux réseaux communiquent largement entre eux par de nombreuses voies d'échange (Chèvremont, 1979).

#### **1.1. Structure.**

Les constituants élémentaires de la paroi des veines sont identiques à ceux de la paroi des artères. La paroi des veines comporte trois tuniques (figure 9):

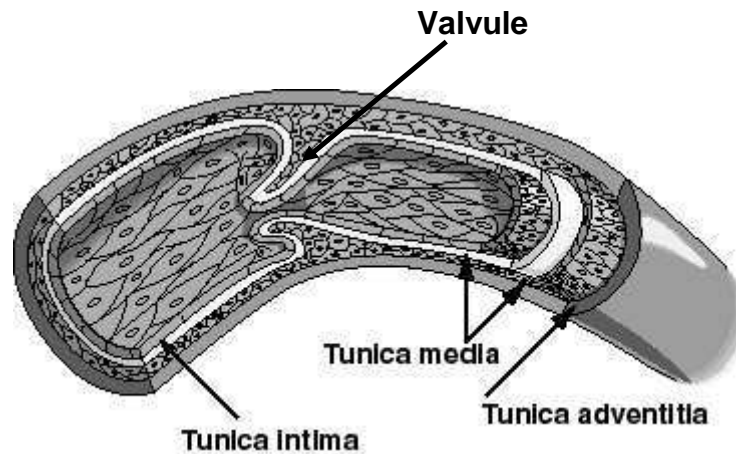
- l'intima : comprenant un endothélium (épithélium pavimenteux simple) reposant sur une lame basale et de façon inconstante une couche conjonctive sous endothéliale faite essentiellement de faisceaux de fibres de collagène, de fibroblastes et à partir d'un certain calibre, d'un nombre variable de fibres élastiques dispersées.

- La média : constituée de cellules musculaires lisses et/ou de lames élastiques.

- L'adventice : composée de tissu conjonctif.

La structure pariétale des veines est comparable à celle des artères mais dans les veines, la média est beaucoup plus mince et l'adventice composée principalement de fibres de

collagène, constituant la majeure partie de la paroi. En effet, la paroi des veines a une structure très variable et une organisation beaucoup moins nette que la paroi artérielle : il n'y a pas de limites élastiques bien individualisées, média et adventice sont souvent confondues et la distinction des trois tuniques apparaît souvent comme bien artificielle (Poirier et Chevreau, 1972).



*Figure 9 : Coupe longitudinale d'une veine saphène.*

Dans les veinules d'environ 50  $\mu\text{m}$  de diamètre, des cellules musculaires lisses apparaissent entre l'endothélium et le tissu conjonctif. Dans les veinules de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre, les cellules musculaires lisses commencent à former un tapis continu et l'adventice devient plus épaisse avec des fibres élastiques éparpillées en plus de fibres de collagène orientées axialement. Dans les veinules de plus grand calibre, les trois tuniques s'individualisent pour former une intima, une média et une adventice. Dans les petites veines (2 mm de diamètre), le muscle lisse devient multicouche, chaque couche étant séparée par une « nappe » de collagène.

Pour que le sang ne reflue pas sous l'effet de la pesanteur lorsque nous sommes debout, l'ensemble du système veineux des jambes est équipé d'un système de valvules (figure 6). Les valvules sont des replis de la paroi interne constituées par un repli de l'intima de la veine renforcé par du tissu conjonctif. En général, les valvules sont formées chacune par deux replis semi-lunaires disposés en regard l'un de l'autre. Leur structure comporte un tissu conjonctif central tapissé par l'endothélium vasculaire. Les voiles valvulaires flottent dans le sens naturel de l'écoulement et s'accolent lorsque le flux s'inverse. Les valvules siègent dans les veines collectrices et on distingue deux sortes de valvules, la valvule pariétale que l'on

rencontre en pleine conduite et la valvule ostiale qui se situe au confluent de deux veines (dans le plus petit des deux vaisseaux). La veine cave inférieure possède toutefois à sa terminaison dans le cœur droit une valvule appelée la valvule d'Eustachi.

## 1.2. Les différents types cellulaires de la paroi vasculaire et leur rôle.

### 1.2.1. Les cellules musculaires lisses.

Les cellules musculaires lisses (CML) sont les constituants principaux de la média (figure 10). Elles sont souvent de forme allongée, fusiforme, organisées en faisceau. Les cellules musculaires lisses de la média ont un double rôle, contractile et sécrétoire. Elles remodelent en permanence le vaisseau en proliférant et en produisant de la matrice extracellulaire. Ce processus physiologique normal est appelé remodelage vasculaire. Il reflète la capacité d'une veine à modifier durablement son diamètre en réponse à certaines situations. Ce processus de remodelage est donc une réponse adaptative soit vers un élargissement soit vers une réduction du calibre veineux (Badier-Commander *et al.*, 2001).

En ce qui concerne les modèles d'étude, deux types de cellules musculaires lisses provenant de veines sont disponibles, il s'agit de cultures primaires de veine ombilicale et de veine iliaque.

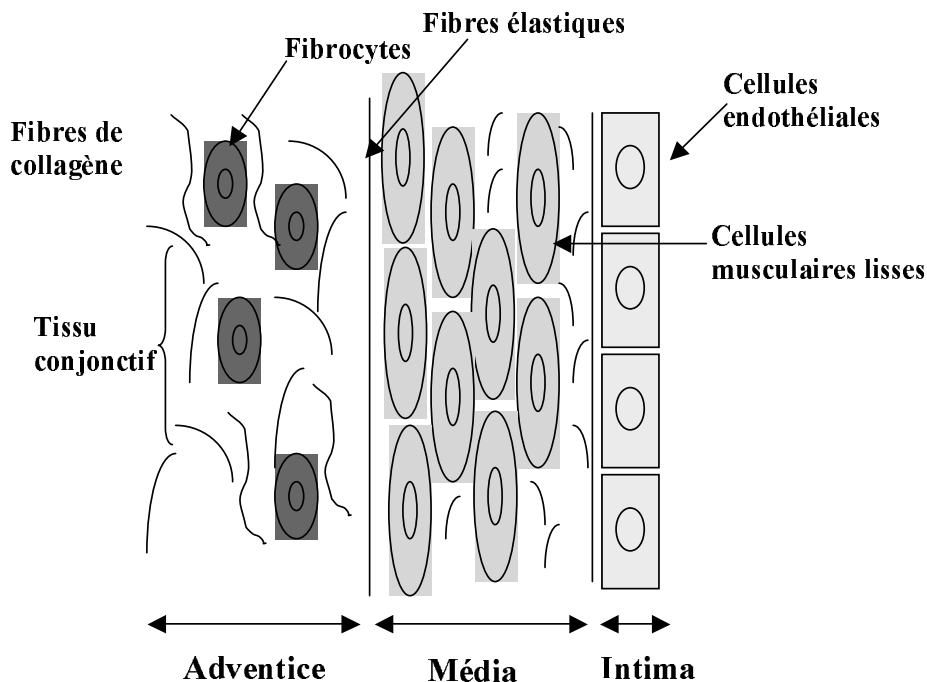


Figure 10 : Schéma de la paroi veineuse. Localisation des différents types cellulaires.

### 1.2.2. Les cellules endothéliales.

A l'interface entre le sang et la paroi vasculaire, l'endothélium qui tapisse l'intima est bien plus qu'une simple barrière physique. Il est aujourd'hui considéré comme un véritable organe très actif impliqué dans la régulation de nombreux processus vasculaires normaux et pathologiques. Il est le constituant principal de l'intima.

L'endothélium est un organe très important recouvrant plus de 5000 m<sup>2</sup> de réseau vasculaire. Les cellules endothéliales sont des cellules aplaties qui forment une sous couche cellulaire, leur renouvellement est très lent. L'endothélium représente, à l'échelle de tout l'organisme une mince surface monocellulaire et très étendue (28 m<sup>2</sup> pour le réseau artériel, 90 m<sup>2</sup> pour les veines et 1500 m<sup>2</sup> au niveau des microvaisseaux) (Guénard, physiologie humaine). L'endothélium régule de nombreuses fonctions vasculaires. Il contrôle, de manière directe et indirecte, la structure vasculaire et assure la quiescence des cellules musculaires lisses (figure 8). L'endothélium sain est une surface anti-adhésive qui empêche le sang de coaguler. Il repousse de manière active les cellules sanguines (plaquettes et leucocytes) qui tenteraient d'adhérer. Ses propriétés anticoagulantes et anti-thrombotiques sont dues à la synthèse de facteurs vasodilatateurs comme le NO, la prostacycline et d'une enzyme très active, l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA).

L'endothélium contrôle le diamètre artériel. En effet, l'étirement de la paroi vasculaire due à des augmentations subites de la pression artérielle stimule la libération de facteurs constricteurs endothéliaux entraînant la contraction du muscle lisse vasculaire sous-jacent, tendant à restaurer ou à maintenir un débit physiologique (Lévy *et al.*, 1996). L'endothélium contrôle le tonus vasculaire en libérant les composants d'un équilibre vasomoteur : d'une part des éléments vasodilatateurs tels que la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), le monoxyde d'azote (NO) et les acides epoxyeicosatriénoïques (EETs) et d'autre part, l'endothéline et les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) qui sont vasoconstricteurs (Levy *et al.*, 1996 ; Roman *et al.*, 2000).

L'endothélium représente la barrière interne du tissu vasculaire et joue un rôle important dans la transmission et la transduction de l'information à partir du sang vers la paroi artérielle sous jacente. Toutes ces propriétés lui confèrent un rôle dans certaines circonstances pathologiques associées à l'inflammation aiguë, aux phénomènes de cicatrisation et aux désordres cardiovasculaires, comme l'athérosclérose.

Plusieurs modèles de cellules endothéliales sont disponibles pour les études *in vitro*. Toutefois, il semble de plus en plus évident que toutes les lignées de cellules endothéliales ne soient pas équivalentes. En effet, les gènes exprimés dans un type de cellules endothéliales ne seront pas identiques à ceux exprimés dans une autre lignée. Ainsi, Chi *et al.*, 2003, ont démontré une expression tissu spécifique dans différentes cellules endothéliales provenant de tissus microvasculaires. Ceci suggère que les types cellulaires endothéliaux sont bien différenciés et jouent des rôles dans la physiologie locale de leurs organes et tissus respectifs.

### **1.2.3. La matrice extracellulaire.**

L'espace qui entoure les cellules, appelé espace extra-cellulaire, contient un ensemble de macromolécules, polysaccharides ou glycosaminoglycanes, protéines fibreuses, sel et eau que l'on désigne sous le nom de matrice extra-cellulaire. La matrice extra-cellulaire contient différents types de collagènes, majoritairement types I et II et également types IV, V, VI, des fibres élastiques, des glycoprotéines et des protéoglycanes (Milroy *et al.*, 1989). Elle joue un rôle essentiel dans la constitution, le maintien et le remodelage de l'architecture tissulaire.

Les constituants de cette matrice extracellulaire sont synthétisés et sécrétés par les cellules comme les fibroblastes et les chondroblastes et décomposés par des enzymes : les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Ces MMPs sont des endopeptidases à zinc qui dégradent différents composants de la matrice extra-cellulaire.

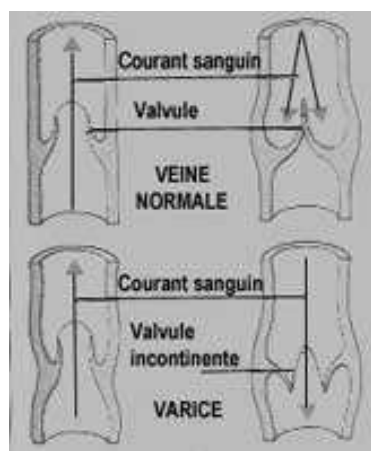
Les MMPs sont des enzymes impliquées dans les processus de remodelage tissulaire normal et pathologique telles que la cicatrisation, l'angiogénèse et l'invasion tumorale (Patterson *et al.*, 2001). Ces enzymes ont différentes spécificités de substrats et sont codés par différents gènes. Les MMP-2 et MMP-9 semblent être les deux protéines matricielles les plus importantes dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire. La MMP-2 est sécrétée par les fibroblastes de peau normaux et la MMP-9 est sécrétée par les macrophages et les granulocytes alvéolaires normaux. La MMP-2 est également appelée collagénase de type IV ou gélatinase. La MMP-9 appelée aussi collagénase IV est une métalloprotéinase matricielle ou gélatinase capable de dégrader le collagène de type IV et de nombreuses autres protéines matricielles. Cette protéine est essentielle au processus de remodelage. Le taux d'ARNm de MMP-9 est augmenté dans les conditions hypoxiques dans les cellules endothéliales (Himmelstein et Koch, 1998).

## 2. Les veines variqueuses.

La pathologie variqueuse est complexe et caractérisée par une hypertension veineuse avec des turbulences sanguines, une stagnation et un reflux suivi de tortuosités anormales de la paroi de la veine (figure 11).

Michiels *et al.*, (1997) ont décrit un mécanisme possible pour expliquer les changements qui se produisent dans la paroi veineuse. Les études histologiques montrent que l'organisation de la composition des parois veineuses variqueuses est profondément altérée. L'apparition de varices s'explique par une perte des éléments de soutien des parois veineuses puisqu'il a été observé dans ces segments, un épaissement de la média due à une accumulation de cellules musculaires lisses et de matrice extra-cellulaire.

Dans la veine variqueuse, les cellules musculaires lisses sont hypertrophiques et autour d'elles, le collagène de type IV est faible et irrégulier. Le nombre total de vasa-vasorum est augmenté dans les segments hypertrophiques et diminué dans les portions atrophiques des veines variqueuses proportionnellement à l'aire de la paroi. Les segments hypertrophiques contiennent des cellules musculaires lisses dédifférenciées. La matrice extra-cellulaire est augmentée, cela semble être une réponse lésionnelle ou un processus d'adaptation de la paroi veineuse à un stimulus hétérogène impliquant un stress mécanique et hypoxique. Les segments atrophiques peuvent représenter une étape finale dans l'évolution des segments hypertrophiques dans lesquels les cellules musculaires lisses ont dégénéré et disparu (Badier Commander *et al.*, 2001).



**Figure 11** : Représentation schématique du flux sanguin dans une veine normale comparée à une veine variqueuse.

## **2.1. Facteurs intervenant dans la pathologie variqueuse.**

### **2.1.1. Facteurs mécaniques.**

Depuis longtemps, il est décrit que les facteurs mécaniques tels que l'augmentation de la pression dans les vaisseaux, l'étirement et le stress mécanique (dus à l'augmentation du flux) contribuent au processus de remodelage. Les changements observés lors de la réponse à des stimuli mécaniques sont l'augmentation de la production de matrice extracellulaire (collagène et élastine) (Tozzi *et al.*, 1989), l'hypertrophie des cellules musculaires lisses et la prolifération des cellules musculaires lisses et des fibroblastes (Kolpakov *et al.*, 1995).

Les forces hémodynamiques induisent des changements fonctionnels variés dans l'endothélium vasculaire, la plupart ayant pour conséquence des altérations de l'expression des gènes. Le stress mécanique de la paroi régule la croissance adaptée des vaisseaux et l'angiogénèse et peut être un risque local dans la pathologie de l'athérosclérose. Le stress mécanique module la production de substances vaso-actives telles que les EETs, les HETEs, le NO, les prostaglandines et l'endothéline et régule la perméabilité macromoléculaire et l'endocytose (Ando *et al.*, 1993 ; Korenaga *et al.*, 1997).

Resnick *et al.*, (1993), ont identifié un élément de réponse au stress mécanique (SSRE) initialement décrit dans la région promotrice du gène *Platelet Derived Growth Factor- $\beta$*  (PDGF- $\beta$ ) puis retrouvé dans d'autres gènes qui répondent au stress mécanique dont ceux de la NO synthase inductible, les gènes des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1, le facteur de croissance *Tumor Growth Factor  $\beta$*  (TGF-  $\beta$ ) et la cyclooxygénase de type 2. Ces études suggèrent un mécanisme général pour la régulation de ces gènes endothéliaux par le stress mécanique.

### **2.1.2. Facteurs chimiques.**

#### **2.1.2.1. L'hypoxie.**

Il a été montré récemment que les conditions anaérobies pouvaient avoir des effets importants sur les fonctions endothéliales. En effet, la stase sanguine dans les veines des membres inférieurs est une situation communément liée au développement de maladies veineuses telles que les varices. Cette stase peut provoquer une ischémie et ainsi diminuer la

disponibilité en oxygène dans les tissus. Cette réduction de la disponibilité en oxygène est une des principales causes des désordres veineux en plus des facteurs génétiques, hormonaux et mécaniques (Michiels *et al.*, 1996). Les mêmes auteurs ont démontré que l'hypoxie active les cellules endothéliales qui libèrent des médiateurs inflammatoires et deviennent adhésives pour les neutrophiles. Ces neutrophiles activés deviennent des leucocytes qui sécrètent des radicaux libres et des protéases qui dégradent la matrice extracellulaire. L'hypoxie peut activer les cellules endothéliales et ainsi initier une cascade de réactions impliquant les neutrophiles et les cellules musculaires lisses.

Récemment, Schmedje *et al.* (1997) ont démontré que l'hypoxie induit l'expression de la cyclooxygénase 2 via l'activation du facteur de transcription NFκB p65 dans les cellules endothéliales humaines. L'hypoxie affecte les deux types de molécules vaso-actives créant des conditions favorables à la vasoconstriction. En effet, la libération d'EDRF de façon basale ou après stimulation par les cellules endothéliales est rapidement inhibée par l'hypoxie et la libération de NO est très faible après de longues périodes d'hypoxie (24h-48h). Par contre, généralement, l'hypoxie augmente la libération d'ET-1 par les cellules endothéliales *in vitro*.

De plus, il a été montré qu'un milieu conditionné pour les cellules endothéliales, hypoxique à court terme induit la prolifération des cellules musculaires lisses. L'augmentation de la production de différents mitogènes combinée avec la suppression de la NO synthase endothéliale peut présenter une accélération de la croissance des cellules musculaires lisses et induire le remodelage vasculaire. Par addition, pour augmenter la libération des facteurs de croissance, l'hypoxie stimule la production de certaines protéines de la matrice extracellulaire, telles que la thrombospondine-1 ce qui module la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (Michiels *et al.*, 2000).

### **2.1.2.2. Facteurs de croissance.**

La prolifération des cellules musculaires lisses et le métabolisme de la matrice extracellulaire peuvent être influencés par différents facteurs et particulièrement par les cytokines. Récemment, il a été montré une augmentation de *Tumor Growth Factor-β1* (TGFβ1) et de *β-Fibroblast Growth Factor* (β-FGF) dans les parois variqueuses (Badier-Commander *et al.*, 2001). Le TGF-β1 peut être impliqué dans l'expression des différentes molécules du tissu conjonctif.

Le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) est une protéine dimérique semblable au *Platelet derived growth factor-B* (PDGF), produit par de nombreux types cellulaires, c'est



un agent mitotique potentiel pour les cellules endothéliales médiant la croissance des cellules endothéliales et la néovascularisation tissulaire. Le gène du VEGF peut être induit par l'hypoxie dans de nombreux types cellulaires incluant les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Il retourne à sa valeur basale lorsqu'il y a eu réoxygénation. De plus, le "PDGF est un facteur inductible par l'hypoxie, il a été décrit comme agissant en synergie avec l'hypoxie dans l'induction de VEGF.

### **2.1.2.3. Les espèces réactives de l'oxygène.**

Les espèces réactives de l'oxygène ou ROS, sont générées par les oxydases liées à la membrane et la myeloperoxydase. La balance oxydative/antioxydative est altérée dans la paroi veineuse particulièrement après une thrombophlébite superficielle. Durant l'hypoxie, le principal changement métabolique est la cassure de l'ATP et sa dégradation en hypoxanthine avec la conversion de la xanthine deshydrogénase en xanthine oxydase ce qui créer des conditions favorables à la génération excessive de radicaux libres (Ratych *et al.*, 1987 ; Zweier *et al.*, 1994). Les ROS semblent être des médiateurs importants des dégâts causés aux parois veineuses dans la pathologie variqueuse. En effet, tout d'abord, il a été observé une augmentation de la xanthine oxydase dans les segments variqueux. D'autre part, les leucocytes, source de ROS, jouent un rôle important dans la pathologie variqueuse (Coleridge- Smith *et al.*, 1988 ; Ciuffetti *et al.*, 1994 ; Takase *et al.*, 1999), en effet, les neutrophiles mais également les monocytes ont été trouvés dans l'endothélium et les interstices de la paroi veineuse (Ono *et al.*, 1998). Quand les monocytes sont stimulés, ils libèrent de grandes quantités de protéases, de produits des phospholipases et des métabolites réactifs de l'oxygène qui sont hautement toxiques pour la paroi veineuse et les tissus sous-jacents (Bradbury *et al.*, 1993). L'augmentation des leucocytes et de l'expression de la xanthine oxydase dans la pathologie variqueuse provoque une libération excessive de ROS accompagnée d'une sécrétion d'enzymes protéolytiques telles que le leucotriènes, les prostaglandines ainsi que des médiateurs inflammatoires. Cette production de ROS et les modifications enzymatiques provoquent une dénaturation des protéines telles que le collagène et l'elastine entraînant un remodelage vasculaire tel que la pathologie variqueuse (Reilly *et al.*, 1991).

Puisque les radicaux libres sont impliqués dans la pathologie variqueuse, les composés anti-oxydants tels que les vitamines C et E peuvent agir comme piègeurs de radicaux libres. De la même façon, les flavonoïdes, également piègeurs d'espèces réactives de l'oxygène, ainsi que leur intermédiaires peuvent également empêcher l'activation d'une cascade induite par l'hypoxie et inhiber l'infiltration des leucocytes et par conséquent la génération d'espèces réactives de l'oxygène (De-Groot *et al.*, 1998 ; Arnould *et al.*, 1996).

#### **2.1.2.4. Réaction inflammatoire.**

L'induction d'un programme pro-inflammatoire par les cellules musculaires lisses vasculaires en apoptose peut contribuer à la physiopathologie des maladies vasculaires (Schaub *et al.*, 2000). Toutefois, le rôle de l'inflammation dans l'insuffisance veineuse chronique n'est pas totalement connu. Seule une étude décrit la libération d'interleukine-1 $\beta$ , d'interleukine-6 et de TNF- $\alpha$  par les monocytes et les macrophages lors de la stase veineuse (Signorelli *et al.*, 2000). Par ailleurs, les cellules endothéliales sont capables de sécréter des médiateurs pro-inflammatoires dont l'IL-1 (Beasley *et al.*, 1995) qui régulent certains CYP impliqués dans le tonus vasculaire (Morgan, 2001).

## **2.2. Le remodelage vasculaire.**

Le remodelage vasculaire est défini comme une étape de changement de la taille et/ ou de la composition des vaisseaux sanguins adultes permettant une adaptation et une réparation. Un remodelage inapproprié, voire aucun remodelage serait impliqué dans une grande partie des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose notamment la resténose (Galis *et al.*, 2002) et la pathologie variqueuse (Badier Commander *et al.*, 2001). Le remodelage vasculaire arrive en réponse à différents stimuli, à la fois physique tels que le stress mécanique et chimique tels que l'hypoxie, les substances vaso-actives et les facteurs de croissance.

L'altération des éléments composant la matrice extra-cellulaire peut s'expliquer par les modifications de biosynthèse et/ou de dégradation de ces composés. Ainsi une perturbation d'expression ou d'activité des enzymes dégradant la matrice extra-cellulaire peut contribuer à l'altération quantitative de ces éléments. De nombreuses études ont montré une modification

de synthèse et d'organisation des protéines composant la matrice extra-cellulaire dans les parois variqueuses. Cependant les résultats de ces études sont souvent contradictoires, probablement du fait de l'hétérogénéité structurale de ces parois et des différentes techniques biochimiques employées pour quantifier ces éléments.

Dans les parois vasculaires et plus précisément au niveau de la matrice extra-cellulaire, les enzymes qui ont le rôle le plus important sont les métalloprotéinases matricielles (MMP). Dans le cas de la pathologie variqueuse, il y a augmentation des enzymes inhibitrices des MMPs : les *Tissue Inhibitor of Metalloprotéinases* (TIMPs). La diminution de l'activité de dégradation des protéines matricielles permettrait d'expliquer en partie l'accumulation de matrice observée au niveau des segments hypertrophiques (Badier-Commander *et al.*, 2000). Des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les facteurs majeurs du remodelage vasculaire tels que les facteurs hémodynamiques, l'inflammation et le stress oxydant régulent l'expression et l'activité des MMPs. Une étude récente a démontré qu'il existe une différence au niveau de l'architecture structurale et de la localisation des MMPs entre les veines normales et variqueuses. Bien que les changements observés ne soient pas suffisants pour déterminer leur véritable rôle dans la pathologie variqueuse, cette étude suggère un mécanisme possible pour l'altération de la composition de la matrice observée entre les veines normales et variqueuses (Woodside *et al.*, 2003).

## **2.3. Modifications cellulaires.**

### **2.3.1. Modification des cellules musculaires lisses.**

Les veines variqueuses diffèrent des saphènes normales par la présence d'une couche musculaire lisse hypertrophiée et la désorganisation de l'élastine. Les cellules musculaires lisses, responsables du tonus vasculaire, ont une structure altérée au sein des média variqueuses, en effet, elles apparaissent hypertrophiques, elles ont perdu leur orientation et leur organisation est largement perturbée (figure 12). Ces observations suggèrent une dédifférenciation des cellules musculaires lisses et une probable modulation d'un phénotype contractile vers un phénotype synthétique. Les cellules musculaires lisses présentent des vésicules proéminentes qui contiennent des micro-filaments et des micro-tubules. Le diamètre de la couche musculaire lisse des veines variqueuses est plus élevé que celui des veines saines (Badier Commander *et al.*, 2001). Cette hypertrophie des cellules musculaires lisses pourrait être à l'origine de la rupture des fibres d'élastine et de la fragilisation des parois

vasculaires. Cette anomalie est segmentaire dans les régions de courbure de veines saphènes. L'hypertrophie de la couche musculaire lisse peut se développer sous l'effet de l'augmentation de la pression sanguine ou lors de la grossesse, ce qui suggère un rôle hormonal.

La pathologie variqueuse serait donc liée au moins en partie à l'augmentation du volume des cellules musculaires lisses sous l'effet de stimuli hormonaux, de facteurs de stress ou d'augmentation de pression sanguine (Kockx *et al.*, 1998).

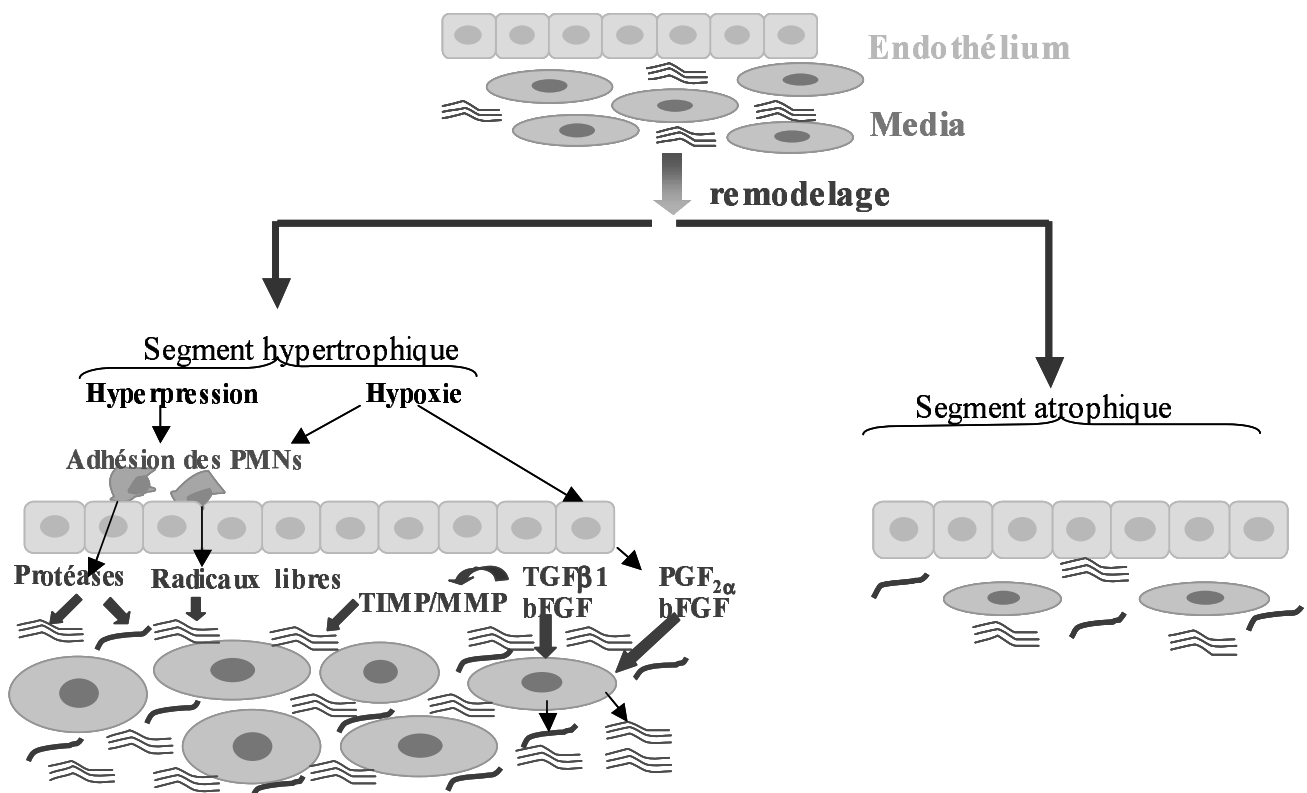


Figure 12 : Remodelage des parois des veines saphènes dans la pathologie variqueuse.

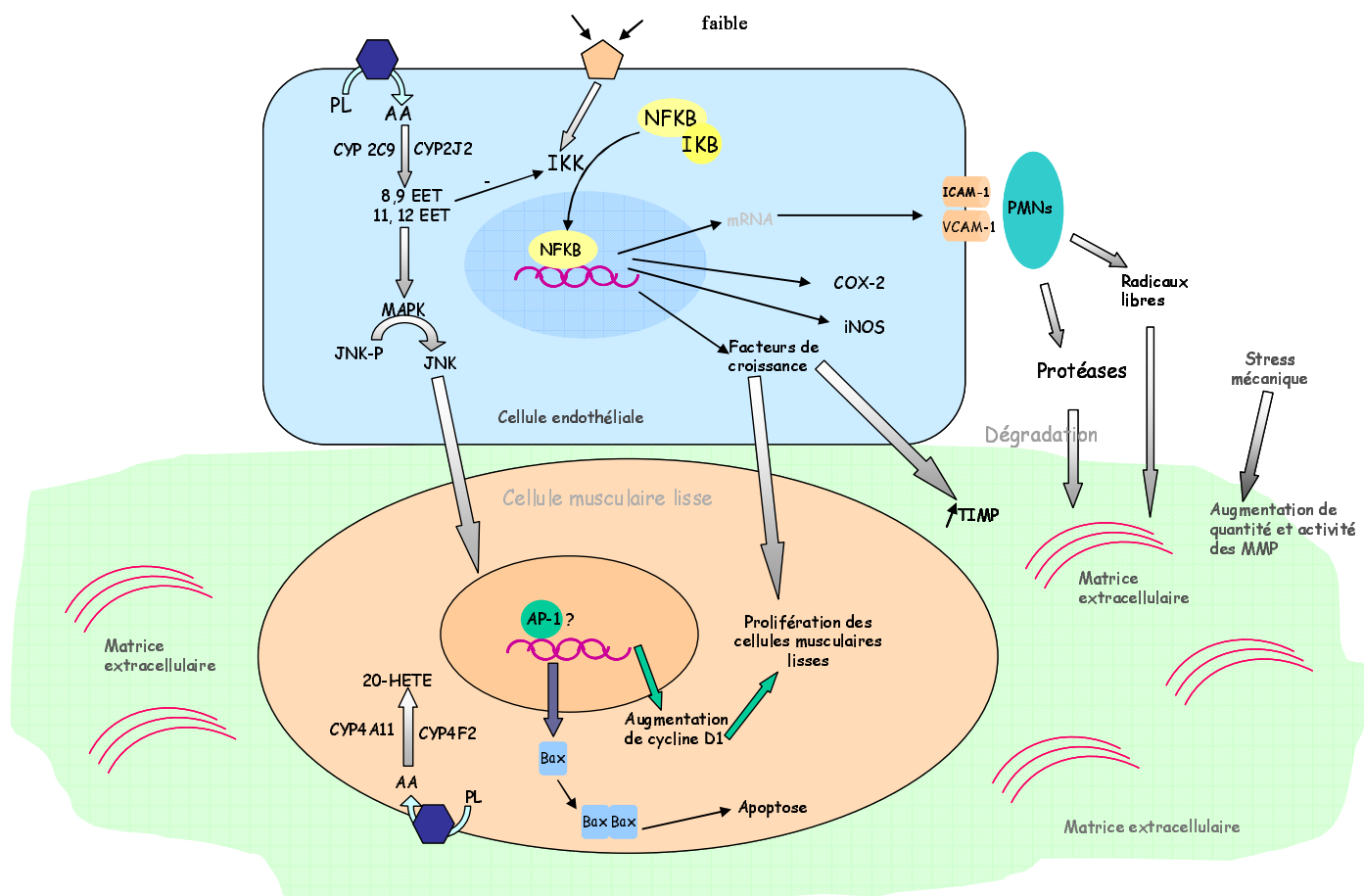
### 2.3.2. Modification des cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales sont exposées en permanence au flux sanguin. Le stress mécanique est une force générée par le flux sanguin qui stimule directement les cellules endothéliales. Ces cellules changent de morphologie et de fonction en réponse à ce stress ce qui se traduit par la sécrétion de différents composés pouvant conduire au remodelage vasculaire et à l'angiogénèse.

### **2.3.3. Modification des macrophages.**

Les monocytes et les macrophages pourraient jouer un rôle dans la pathologie de l'insuffisance veineuse primaire. Un élément important de leur rôle pourrait être l'interaction entre les monocytes et l'endothélium comme un précurseur de dommage aux valves veineuses et aux parois veineuses (Takase *et al.*, 2000).

Toutes ces modifications cellulaires sont une cause et/ou une conséquence de la pathologie variqueuse. En effet, comme nous l'avons vu, c'est une maladie très complexe caractérisée par de nombreux changements tant au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses que de la matrice extracellulaire. Les remaniements observés interviennent à la suite de différents stimuli tels que le stress mécanique, l'hypoxie ou encore les facteurs inflammatoires (figure 10). Cette introduction a décrit les facteurs et les modifications les plus importants intervenant dans le développement de la pathologie variqueuse. Compte tenu de la complexité de cette pathologie, la suite de ce travail traitera plus particulièrement du rôle des enzymes impliquées dans la production de métabolites vaso-actifs : les cytochromes P450. Dans la revue présentée ci-après, nous avons résumé et explicité le rôle des cytochromes P450 dans la pathologie variqueuse.



**Figure 13 :** Schéma récapitulatif des facteurs influençant le tonus vasculaire dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et la matrice extracellulaire, interrelation entre ces différents éléments.

## **IV. Régulation des cytochromes P450 présents dans les tissus cardiovasculaires.**

### **1. La régulation.**

La variabilité d'expression intra et inter-espèces des cytochromes P450 est modulée à deux niveaux : d'une part par des facteurs non génétiques incluant les facteurs environnementaux (inducteurs ou inhibiteurs), le sexe, l'âge, la physiologie, les pathologies, le tissu et d'autre part par les facteurs génétiques tels que le polymorphisme.

#### **1.1. Définition.**

Les gènes des cytochromes P450 sont régulés par de nombreuses voies et à des taux multiples. Ils présentent une expression tissu-spécifique et sont régulés par des hormones endogènes (stéroïdes, progestérone,...) et des cytokines. Les gènes des cytochromes P450 répondent à différents composés chimiques qui augmentent souvent le taux de protéines par stimulation de l'initiation de la transcription de gènes. Cette induction des cytochromes P450 a un impact majeur sur le métabolisme dépendant de ces enzymes ce qui peut entraîner une modification de la pharmacocinétique et provoquer des interactions médicamenteuses. De plus, un changement au niveau du métabolisme des cytochromes P450 peut avoir des conséquences au niveau de la toxicité et de la carcinogénicité des composés chimiques endogènes ainsi que sur l'activité et la disponibilité des hormones endogènes (Conney, 1982).

La plupart des gènes des cytochromes P450 appartenant aux familles 1 à 4 peuvent être activés de façon transcriptionnelle par des composés chimiques étrangers qui induisent l'expression des gènes des CYPs par l'intermédiaire d'un des quatre mécanismes dépendant de différents récepteurs.

Il existe différentes classes de récepteurs impliqués dans les régulations des cytochromes P450 vasculaires, notamment les récepteurs cytosoliques tel que le récepteur *Aryl Hydrocarbone* (AhR) et les récepteurs nucléaires tels que le récepteur des glucocorticoïdes (GR), le récepteur répondant au phénobarbital et aux composés dits « *phénobarbital like* » (CAR) et le récepteur répondant au pregnanes (PXR) qui nous intéresseront plus particulièrement dans cette étude. Ces différentes classes de récepteurs nucléaires seront décrites ci-après.

### 1.1.1. Le récepteur CAR.

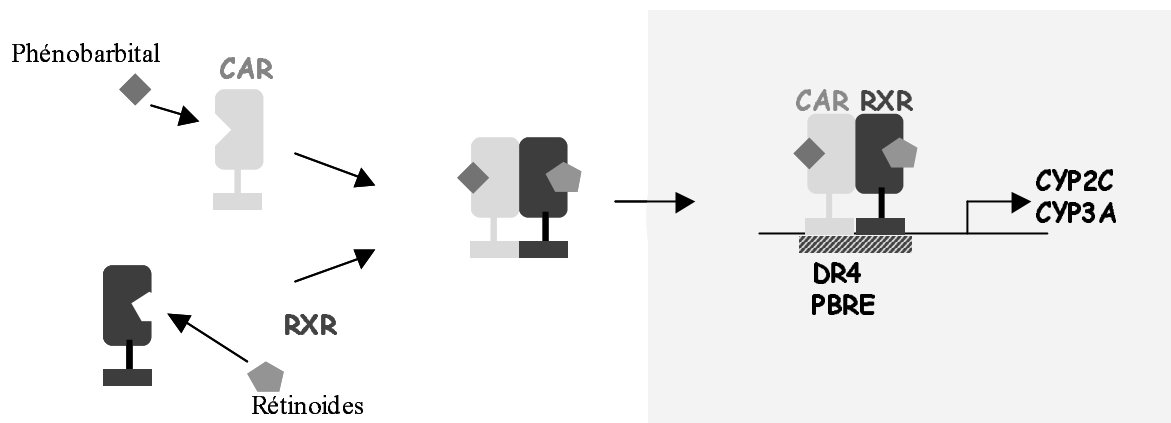
Le récepteur CAR (*Constitutif Androstane Receptor*) est un récepteur orphelin caractérisé comme un activateur constitutif de l'élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE). Ce récepteur est appelé constitutif parce qu'il est capable d'activer l'élément RARE et d'autres éléments de réponse en absence de ligand. Ce récepteur est principalement exprimé dans le foie et l'intestin (Baes *et al.*, 1994).

Le récepteur CAR possède deux catégories de ligands : les dérivés de l'androstanol et androsténol) qui sont inhibiteurs de la transactivation mais n'influencent pas la formation de l'hétérodimère CAR/RXR ni la fixation à l'ADN mais inhibent l'interaction avec les co-activateurs (Forman *et al.*, 1998), les xénobiotiques du type phénobarbital qui augmentent le recrutement constitutif des co-activateurs (Tzamelis *et al.*, 2000).

Le récepteur CAR se lie à chaque site PBRE (*PhenoBarbital Response Element*) en formant un hétérodimère avec le récepteur aux rétinoïdes RXR (*Retinoid X Receptor*), récepteur servant d'hétérodimère pour de nombreux récepteurs orphelins (Mangelsdorf *et al.* 1995) (figure 14). l'hétérodimère CAR/RXR peut se fixer à un élément de réponse DR4 (Zelko et Negishi, 2000). De plus, des demi-sites GRE (*Glucocorticoid response element*) capables de se lier au récepteur GR ont été retrouvés sur la région régulatrice de CAR. L'interaction de cette voie de régulation GR avec la voie de signalisation médiée par CAR suggère l'activation d'une cascade de réactions impliquant différentes étapes. Ces étapes pourraient être les suivantes : (1) activation de GR par les glucocorticoïdes, (2) induction de CAR activé par le GR, (3) activation de CAR par ses activateurs connus et (4) induction de certains gènes cibles de CAR par CAR activé. Ce qui suggère que les activateurs de GR et



CAR doivent être présents pour cette succession d'événements. Enfin, très récemment, il a été démontré que le récepteur nucléaire CAR pouvait se lier à un nouvel élément de réponse aux xénobiotiques XREM (*Xenobiotic response enhancer module*) (Wang *et al.*, 2003a).



**Figure 14:** Représentation de la fixation de l'hétérodimère CAR/RXR sur l'élément de réponse au phénobarbital (PBRE) et l'élément de réponse DR4.

Le récepteur CAR est impliqué dans l'induction de CYP2B en réponse au phénobarbital et d'autres composés lipophiliques appelés « *phénobarbital like* » (Sueyoshi *et al.*, 1999), dans l'induction de deux principaux cytochromes P450 : le CYP3A4 (Sueyoshi *et al.*, 1999 ; Goodwin *et al.*, 2002) et le CYP2C9 (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2002) et dans l'induction de l'expression d'un cytochrome P450 réductase (Ueda *et al.*, 2002). Ce récepteur nucléaire régule également d'autres protéines telles que le polypeptide 2 transporteur d'anion (Oatp2) (Guo *et al.*, 2002) et la protéine 2 associée à une résistance multi-drogue (MRP2) (Kast *et al.*, 2002). La régulation du récepteur CAR pourrait être impliquée dans certaines pathologies. Ainsi, une diminution de l'expression de CAR pourrait provoquer une diminution de l'expression de OATP2 et de la MRP2 conduisant à une cholestase intra-hépatique. De plus, il a été démontré que CAR participe à la clairance de la bilirubine (Huang *et al.*, 2003). D'une part, la bilirubine induit la translocation de CAR dans les hépatocytes humains et d'autre part, CAR contrôle l'expression de certains gènes impliqués

dans l'élimination de la bilirubine tels que le transporteur d'anion SLC21A6 (Huang *et al.*, 2003), l'enzyme de phase II UDP-glucuronyltransférase UGT1A1 (Sugatani *et al.*, 2001) et la MRP2 (Kast *et al.*, 2002).

Il a également été observé que le récepteur CAR est inhibé par certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 (Pascussi *et al.*, 2000c) ou le LPS (Beigneux *et al.*, 2002).

Ces résultats montrent que la régulation de CAR est relativement complexe et fait intervenir différents facteurs notamment le récepteur nucléaire GR. De plus il semble que CAR intervienne dans la régulation de nombreux gènes importants au niveau du fonctionnement cellulaire. Ainsi l'ensemble de ces données suggère que le récepteur CAR exprimé de façon constitutive soit présent dans d'autres organes, qu'il soit régulé par des composés variés exogènes ou endogènes et que cette régulation soit impliquée dans différentes fonctions cellulaires.

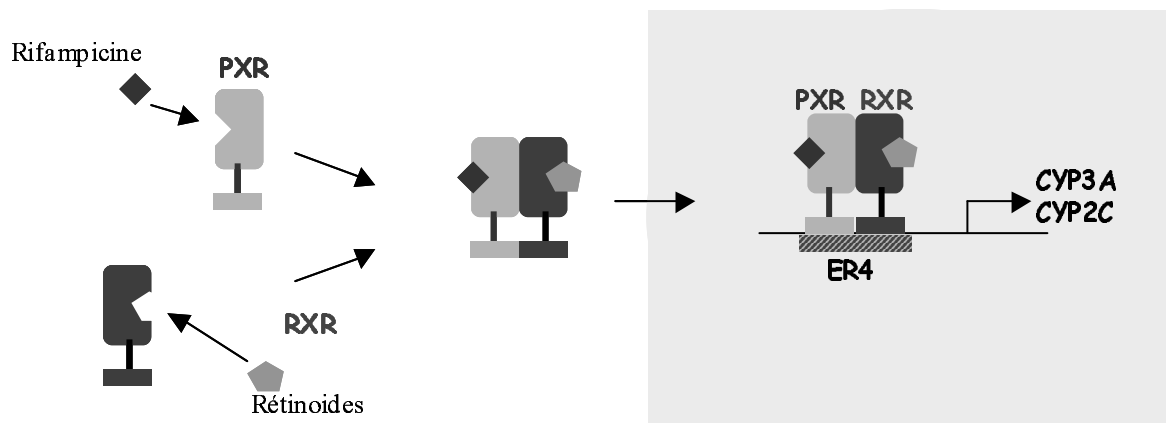
### **1.1.2. Le récepteur PXR.**

Le récepteur PXR (*Pregnane X Receptor*) est également appelé PAR ou SXR. Le récepteur est exprimé principalement dans le foie, l'intestin grêle et le colon, (Lehmann *et al.*, 1998) mais également dans les tissus où les CYP3A sont présents (Moore et Kliewer, 2000).

Le récepteur PXR s'hétérodimérise avec le récepteur RXR, se lie et transactive l'élément ER6 et DR3 (Kliewer *et al.*, 1998 ; Lehmann *et al.*, 1998 ; Bertilsson *et al.*, 1998 ; Blumberg *et al.*, 1998 ; Waxman, 1999) (figure 15). Il a été démontré récemment que le récepteur PXR pouvait se lier à l'élément de réponse au phénobarbital (PBREM) situé dans la région 5' flanquante du gène CYP2B (Xie *et al.*, 2000 ; Goodwin *et al.*, 2001). Enfin, le récepteur PXR pourrait également se lier à un nouvel élément de réponse aux xénobiotiques : XREM (*xenobiotic response enhancer module*) (Wang *et al.*, 2003a). Comme pour le récepteur CAR, il semblerait qu'il existe une relation croisée entre les deux récepteurs nucléaires PXR et GR. En effet, il a été démontré que le récepteur GR contrôle l'expression des récepteurs PXR et RXR (Pascussi *et al.*, 2000b).

Il active les gènes des cytochromes de la famille 3A en réponse à différents composés chimiques incluant certains composés naturels et synthétiques. Il est également impliqué dans

l'induction du CYP2B6 (Goodwin *et al.*, 2002) et des CYP2C8 et CYP2C9 (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2001 ; Gerbal-Chaloin *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2004). Ce récepteur est activé par de nombreux composés chimiques endogènes ou exogènes tels que la rifampicine, le phénobarbital, la nifédipine et d'autres composés bloquants des canaux calciques (nifedipine, nicardipine, isradipine) (Drocourt *et al.*, 2001), le clotrimazole, la mifepristone, la metyrapone et la lovastatine (Bertilsson *et al.*, 1998 ; Blumberg *et al.*, 1998 ; Lehmann *et al.*, 1998 ; Moore et Kliewer, 2000 ; El-Sankary *et al.*, 2000).



**Figure 15:** Représentation de la fixation de l'hétérodimère PXR/RXR sur l'élément de réponse ER6.

Le gène PXR induit également l'expression du gène MDR1 (Multiple Drug Resistance) codant pour un transporteur qui protège la cellule contre la xénotoxicité en permettant une sortie rapide des drogues (Synold *et al.*, 2001). Ce résultat élargi le rôle de PXR à la fois au métabolisme et à la clairance des drogues.

D'un point de vue physiologique, deux équipes (Staudinger *et al.*, 2001 ; Xie *et al.*, 2001) ont montré de façon concomitante le rôle du récepteur PXR dans la protection contre l'hépatotoxicité des acides biliaires. Les résultats obtenus par ces équipes montrent que les acides biliaires primaires et secondaires sont des activateurs de faible affinité de PXR, in vitro sans distinction d'espèce et des inducteurs de l'expression du cyp3a11 hépatique chez la souris. Cependant, la génération de souris PXR nulles montre qu'elle conservent une capacité de réponse à l'acide lithocholique pour induire le CYP3A mais des observations histologiques montrent une protection diminuée après traitement. Ces résultats illustrent l'existence de voies cellulaires alternatives ou compensatoires qui pourraient faire intervenir les récepteurs PXR ou CAR ; De plus, l'implication du PXR dans la régulation négative du cyp7a (responsable de

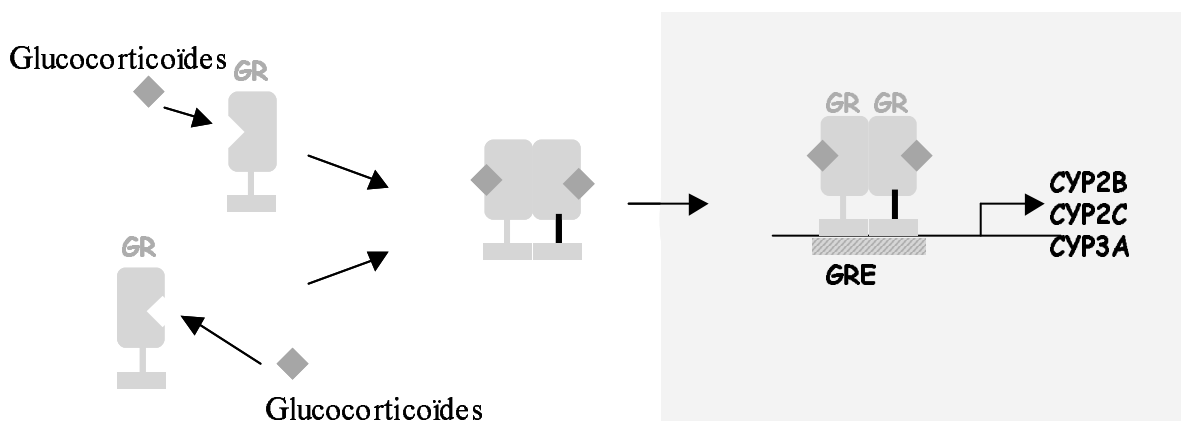
la première étape de synthèse de l'acide lithocholique) et positive du *cyp3a11* (responsable du catabolisme de l'acide lithocholique) et de *oatp2* montre l'effet hépato-protecteur du PXR.

La présence du récepteur nucléaire PXR et de la régulation de différents gènes au notamment les CYP3A montre l'importance de ce récepteur au niveau hépatique.

### 1.1.3. Le récepteur GR.

Le récepteur GR est présent dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Eickelberg *et al.*, 1999 ; Kawai *et al.*, 1998). Il a également été localisé dans les cellules endothéliales d'aortes bovines (Ji *et al.*, 2003), dans la lignée de cellules EA.hy926 (Newton *et al.*, 2003), dans les cellules endothéliales d'endomètre humain (Bamberg *et al.*, 2001). Ce récepteur est impliqué dans l'induction des gènes des familles 2B, 2C et 3A (Pascussi *et al.*, 2000a ; Pascussi *et al.*, 2000b ; Gerbal-Chaloin *et al.*, 2002). Dans le foie, le récepteur GR est exprimé constitutivement et le taux de ce récepteur n'est pas affecté par les glucocorticoïdes ou d'autres xénobiotiques. En revanche, il a été démontré dans des cultures d'hépatocytes traitées par des glucocorticoïdes, une augmentation des taux de CAR, PXR et de RXR est suivie d'une induction potentielle des CYP2B6, CYP2C8/9 et CYP3A4 (Pascussi *et al.*, 2000a ; Pascussi *et al.*, 2000b). En effet, récemment, il a été démontré que l'activation du récepteur GR est suivie d'une induction du récepteur CAR (Pascussi *et al.*, 2003).

Le récepteur GR s'hétérodimérise avec lui-même et se lie sur l'élément de réponse aux glucocorticoïdes, il se lie à l'élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) (figure 16).

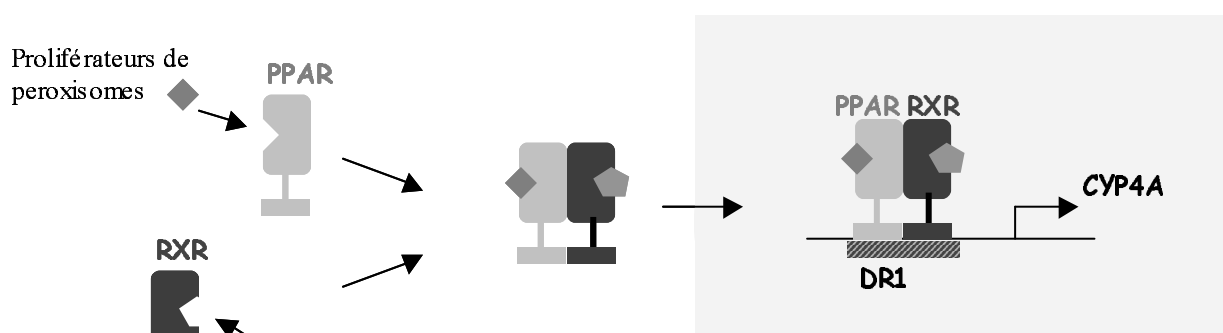


## Figure 16: Représentation de la fixation de l'homodimère GR/GR sur l'élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE).

Parmi les rôles pharmacologiques majeurs du GR, les activités anti-inflammatoire et immunosuppressive se font principalement par la capacité du GR d'inhiber l'activité transcriptionnelle des facteurs nucléaires NF $\kappa$ B et AP-1 (Kellendonk et al., 1999). Le rôle du GR dans les mécanismes de défense de l'organisme contre les xénobiotiques a été élucidé en montrant que le GR induisait la synthèse de deux récepteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle du cytochrome P450 3A4 (Pascussi *et al.*, 2000 (a) ; Pascussi *et al.*, 2000 (b)). En effet, ces travaux ont montré que l'action du récepteur aux xénobiotiques PXR ainsi que son partenaire RXR était potentialisée par le glucocorticoïde de synthèse dexaméthasone

### 1.1.4. Les récepteurs PPAR.

Les récepteurs de proliférateurs de peroxyosomes activés (PPAR) sont membres de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux des facteurs de transcription. Les PPARs forment des hétérodimères avec le récepteur aux rétinoïdes. Cette famille de récepteurs regroupe 3 formes différentes PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  appelé aussi PPAR $\delta$  et PPAR $\gamma$  (Desvergne et Wahli, 1999). L'induction des cytochromes P450 de la famille 4A par les proliférateurs de peroxyosomes et les acides gras est réalisée par l'intermédiaire du PPAR $\alpha$  qui se lie sur un élément de réponse avec le récepteur RXR (figure 17). L'élément de réponse contient deux motifs de liaison séparés par un simple nucléotide appelé DR1 (Waxman 1999 ; Johnson *et al.*, 2002).



## **Figure 17: Représentation de la fixation de l'hétérodimère PPAR/RXR sur l'élément de réponse DR1.**

### **1.2. La régulation des cytochromes P450.**

La plupart des cytochromes P450 exprimés dans les tissus vasculaires que nous avons décrits précédemment dans le chapitre 1 sont régulés par un ou plusieurs de ces récepteurs. Les mécanismes de régulation font intervenir une substance endogène ou exogène qui active le récepteur approprié afin d'induire la transcription du cytochrome concerné. Une régulation positive ou négative d'un cytochrome peut intervenir dans des défauts de métabolisation des composés endogènes ou exogènes conduisant parfois à des métabolites toxiques qui contribuent à augmenter le risque de cancers et d'autres effets toxiques (Nebert et Russell, 2002).

#### **1.2.1. Le cytochrome P450 1B1.**

Le CYP1B1 est un membre de la sous famille 1 des cytochromes P450 qui est inductible par les hydrocarbures polycycliques. En effet, le CYP1B1 est induit par le TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin), la  $\beta$ -naphtoflavone, le benzopyrène, le DMBA (2,4-Dimethylbenzoic Acid), l'acide benzoïque, la DHEA (dehydroepiandrosterone), les amines hétérocycliques dans différents tissus ou cellules : tumeurs mammaires ou cellules MCF-7, astrocytomes, fibroblastes, poumon, foie ou cellules HepG2, lymphocytes (Murray *et al.*, 2001) et dans les cellules musculaires lisses vasculaires humaines (Zhao *et al.*, 1998). Les

cytokines pro-inflammatoires régulent aussi CYP1B1. Le TNF- $\alpha$  augmente l'expression dans des cellules stellaires hépatiques (Piscaglia *et al.*, 1999) et l'IL1 $\beta$  augmente le taux d'ARNm de CYP1B1 dans l'astrocytome U373-MG (Malaplate-Armand *et al.*, 2003). Au contraire, le trans-resveratrol (3, 4, 5' trihydroxytranstilbène) diminue le taux d'ARNm et l'activité de CYP1B1 dans les cellules MCF-7 (Chang *et al.*, 2000). Par ailleurs, le CYP1B1 est régulé par le récepteur Aryl hydrocarbure qui est activé par différents composés notamment les hydrocarbures polycycliques (McFadyen *et al.*, 2003).

## **1.2.2. Les cytochromes P450 de la famille 2C.**

### **1.2.2.1. Le cytochrome P450 2C8.**

CYP2C8 est inductible par des composés connus comme inducteurs de CYP3A4 tels que le phénobarbital, la rifampicine (Madan *et al.*, 2003), la dexaméthasone (Pascussi *et al.*, 2000). Le taux de la protéine CYP2C8 est également augmenté après exposition aux médicaments anti-cancéreux : la cyclophosphamide et l'ifosfamide (Chang *et al.*, 1997) Le CYP2C8 est inhibé par des composés divers tels que le kétoconazole, le diéthylthiocarbamate (Ong *et al.*, 2000), le triméthoprim (Wen *et al.*, 2002), la buprenorphine (Umehara *et al.*, 2002), le gemfibrozil (Wang *et al.*, 2002 (a)), la troglitazone, médicament utilisé dans le traitement du diabète non insulino dépendant (Sahi *et al.*, 2003) et des inhibiteurs de canaux calciques : la nilvadipine (Niwa *et al.*, 2004). Le CYP2C8 est inductible par différents composés activateurs de CAR et PXR tels que le phénobarbital et la rifampicine. Compte tenu de ces données, Gerbal-Chaloin *et al.*, (2001) ont émis l'hypothèse que les deux récepteurs nucléaires CAR et PXR intervenaient au moins en partie dans la régulation de l'expression de CYP2C8.

### **1.2.2.2. Le cytochrome P450 2C9.**

Le cytochrome P450 2C9 est inductible par différents composés tels que la rifampicine (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2001 ; Niemi *et al.*, 2003), l'hyperforine, les glucocorticoïdes (Pascussi *et al.*, 2003), le phénobarbital (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2004), les modulateurs de canaux calciques (nifédipine, nicardipine, isradipine) (Drocourt *et al.*, 2001), ainsi qu'un antagoniste des récepteurs NK, l'aprépitant (Shadle *et al.*, 2004). Il a également été démontré dans le foie humain que le CYP2C9 était inductible par les produits contenus dans la fumée de cigarette (Villard *et al.*, 1994). Le CYP2C9 est également inductible par deux molécules utilisées dans le traitement de l'hypercholestérolémie : la cérivastatine et la fluvastatine. Ces deux molécules induisent l'expression de ce cytochrome d'environ deux fois pour les concentrations de 0,1 à 1  $\mu$ M (Fisslthaler *et al.*, 2003).

Par ailleurs, le CYP2C9 est inhibé par le sulfaméthoxazole (Wen *et al.*, 2002), par la nilvadipine (Niwa *et al.*, 2004) et par la médroxyprogestérone (Laine *et al.*, 2003). Ce cytochrome P450 est réprimé par l'interleukine-6, cette répression est due à une régulation négative des récepteurs CAR et PXR (Pascussi *et al.*, 2000 (c)). De plus, la présence d'un élément transcriptionnel responsable de la répression du CYP2C9 a été localisé dans la région codante de la protéine juste après le codon start (Xiang *et al.*, 1998).

Il a été démontré que le récepteur des glucocorticoïdes intervient dans la régulation de l'expression de CYP2C9 mais que cette induction pouvait également faire appel à l'activation des récepteurs CAR et PXR (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2002). En effet, une première étude a démontré que le cytochrome P450 2C9 est inductible par certains composés tels que la rifampicine induisant également l'expression des cytochromes P450 de la famille 3A, ce qui suggère que ce cytochrome P450 est inductible au moins en partie par l'intermédiaire du récepteur PXR (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2001). Mais ce n'est très récemment qu'une étude a démontré qu'un élément de réponse au PXR était présent en position -1839/-1824 en amont du promoteur de CYP2C9, ce qui prouve que PXR intervient dans l'induction de CYP2C9 (Chen *et al.*, 2004).

### **1.2.2.3. Le cytochrome P450 2C18.**

Aucune information n'est connue concernant l'induction ou la régulation de CYP2C18. Néanmoins, certains auteurs ont montré que la rifampicine n'a pas d'effet sur



l'expression de CYP2C18 (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2001 ; Rae *et al.*, 2001), ce qui laisse à penser que le CYP2C18 n'est pas régulé par le récepteur PXR.

#### **1.2.2.4. Le cytochrome P450 2C19.**

L'expression de CYP2C19 est induite par des composés tels que la rifampicine et le phénobarbital (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2001) mais également par la dexaméthasone (Raucy *et al.*, 2002), ce qui laisse suggérer que les trois récepteurs CAR, GR et PXR soient impliqués dans la régulation de ce cytochrome. Le cytochrome P450 2C19 est inhibé par un anticonvulsivant : l'oxcarbazépine (Bang *et al.*, 2003), par des médicaments utilisés dans le traitement du diabète : la troglitazone, la rosiglitazone et la pioglitazone (Sahi *et al.*, 2003), par les hormones de croissance (Jurgens *et al.*, 2002) et par deux progestatifs : le gestodène et le 3-kétodesogestrel (Laine *et al.*, 2003).

#### **1.2.3. Le cytochrome P450 2E1.**

La régulation de ce cytochrome P450 se fait essentiellement par des mécanismes post-transcriptionnels (Koop et Tierney, 1990) plutôt que par des mécanismes transcriptionnels (Song *et al.*, 1986, Yang *et al.*, 1990). Ce cytochrome P450 est induit par le pyrazole, le 4-méthylpyrazole, l'acétone, l'isoniazide, l'éthanol, l'isopropanol, la pyridine et le benzène (Song *et al.*, 1986, Koop et Laethem, 1992) mais également la nicotine (Howard *et al.*, 2003). Certains états pathologiques, provoquant une accumulation de cétones, peuvent induire le CYP2E1, c'est le cas du jeûne, du diabète et de l'obésité. De plus, il a été démontré que l'urée plasmatique induisait également le CYP2E1 (Chung *et al.*, 2002). Le Lipopolysaccharide (LPS) augmente l'activité de CYP2E1 (Warren *et al.*, 2001) et l'interleukine-4 augmente le taux d'ARNm de CYP2E1 (Abdel-Razzak *et al.*, 1993). Le cytochrome P450 2E1 est inhibé par la buprénorphine (Umehara *et al.*, 2002), la troglitazone, la rosiglitazone et la pioglitazone (Sahi *et al.*, 2003), le resveratrol et l'épsilon-viniferin (Piver *et al.*, 2003).

#### **1.2.4. Le cytochrome P450 2J2.**

Des données préliminaires suggèrent que les cytochromes P450 2J peuvent être épissés de façon alternative. Ce phénomène pourrait servir de mécanisme de régulation à la

fonction cytochrome P450 endogène. Une étude récente décrit l'induction de CYP2J2 par la cocaïne chez les souris (Wang *et al.*, 2002 (b)). Le CYP2J2 est également régulé négativement dans les conditions hypoxiques (Marden *et al.*, 2003).

## **1.2.5. Les cytochromes P450 de la famille 3A.**

### **1.2.5.1. Le cytochrome P450 3A4.**

Le gène du cytochrome P450 3A4 est induit en réponse à de nombreux composés. Dans les hépatocytes humain, le CYP3A4 est inductible par la rifampicine, la dexaméthasone, les modulateurs des canaux calciques tels que la nifédipine et ses dérivés, par le phenobarbital, la vitamine D, la troglitazone (Dimaraki *et al.*, 2003). Les cytochromes P450 de la famille 3A sont inductibles par certaines molécules hypocholestérolémiantes : les statines. En effet, il a été démontré que la lovastatine (Schuetz *et al.*, 1993), la simvastatine et la fluvastatine augmentent les quantités d'ARNm de CYP3A dans les hépatocytes humains en culture (Kocarek *et al.*, 2002). De façon étonnante, une étude décrit l'inhibition de l'activité de CYP3A4 par la fluvastatine, la simvastatine et la lovastatine dans les hépatocytes humains (Cohen *et al.*, 2000). Le CYP3A4 est inhibé par le ketoconazole, le diltiazem et le tamoxifène (Zhao *et al.*, 2002), par le gestodène et le 3-ketodesogestrel (Laine *et al.*, 2003) et par des composés contenu dans les jus de fruits notamment dans le jus de pamplemousse (Rashid *et al.*, 1993). L'interleukine-6 (IL-6) (Jover *et al.*, 2002 ; Pascussi *et al.*, 2000 (c) ; Abdel-Razzak *et al.*, 1993), le LPS (Warren *et al.*, 2001) mais également les interleukines 1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Abdel-Razzak *et al.*, 1993) répriment CYP3A4.

Lehmann *et al.*, (1998) ont identifié un récepteur nucléaire orphelin humain appelé Pregnane X Recepteur (PXR) qui se lie à un élément de réponse sur le promoteur du CYP3A4. Ce récepteur est activé par de nombreux médicaments connus comme inducteurs de ce cytochrome P450. L'induction des cytochromes P450 3A se fait par l'intermédiaire de un ou plusieurs facteurs cellulaires. Xie *et al.*, (2000) ont identifié le PXR/SXR comme un de ces facteurs. Les pièces importantes du système de régulation des cytochromes P450 3A sont les récepteurs PXR/RXR (Moore et Kliewer., 2000). Le récepteur des glucocorticoïdes est également impliqué dans la régulation de ce cytochrome P450 (Waxman, 1999). De plus, la vitamine D induit le cytochrome P450 3A4 ce qui ouvre la possibilité d'une régulation médiée

par le récepteur de la vitamine D qui interagirait avec l'élément de réponse PXRE (Wrighton *et al.*, 2000). Par ailleurs, la Pgp (p-glycoprotéine) pourrait influencer l'amplitude de l'induction de CYP3A, en modifiant l'activation du récepteur PXR (Wrighton *et al.*, 2000). Le récepteur PXR n'est pas exprimé dans les tissus cardio-vasculaires (Moore et Kliewer., 2000) alors que la dexaméthasone est un inducteur efficace des cytochromes P450 3A dans les cellules endothéliales aortique de porc (PAEC) et bovine (BAEC), les cellules endothéliales humaines : Eahy926 et ECV304 (Hoebel *et al.*, 1998). On peut alors supposer que l'induction du CYP3A4 s'effectue soit par GR seul soit par une cascade d'induction de GR, PXR (Pascussi *et al.*, 2000 (a), 2000(b)).

### 1.2.5.2. Le cytochrome P450 3A5.

La plupart des études de régulation des cytochromes P450 de la famille 3A concernent le cytochrome P450 3A4. Seules quelques études décrivent également le rôle de certains composés sur l'expression du CYP3A5. Le cytochrome P450 3A5 a été trouvé principalement dans le poumon, où des études de régulation de ce cytochrome P450 ont été réalisées (Anttila *et al.*, 1997).

Le cytochrome P450 3A5 est régulé par différents composés qui interviennent également dans la modulation de l'expression et de l'activité du CYP3A4. Parmi les composés impliqués, l'oxycarbamazépine (Bang *et al.*, 2003) et le modafinil (Robertson *et al.*, 2002) induisent l'expression de ce cytochrome P450, mais également la dexaméthasone et l'hyperforine du millepertuis (Krusekopf *et al.*, 2003). L'expression de CYP3A5 est diminuée par la fumée de cigarette (Hukkanen *et al.*, 2003). La bergamottine présente dans les jus de fruits est responsable de l'inhibition de l'expression des cytochromes P450 de la famille 3A (Wen *et al.*, 2002). L'azamuline diminue également l'expression des cytochromes P450 de la famille 3A (Stresser *et al.*, 2004), le kétoconazole inhibe le CYP3A5 mais l'effet inhibiteur est moins marqué que pour le CYP3A4 (Patki *et al.*, 2003).

Une séquence nucléotidique contenant un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) de 15 pb a été trouvée dans le gène du CYP3A5. Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) semble être indispensable à l'induction de ce cytochrome P450 (Schuetz *et al.*, 1996).

Iwano *et al.*, (2001) ont montré que le CYP3A5 était régulé par le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, et par les protéines de spécificité Sp1 et Sp3 dans les cellules HepG2. Ces auteurs ont montré que ces protéines se lient à des éléments de réponse : la boîte CCAAT en -78/-68 et un élément de transcription de base : BTE en position -67/-46 sur le gène du CYP3A5.

### **1.2.5.3. Le cytochrome P450 3A7.**

Le cytochrome P450 3A7 est inductible par la rifampicine, la phénytoïne, le clotrimazole et la cyclosporine (Usui *et al.*, 2003).

Le cytochrome P450 3A7 est régulé comme tous les cytochromes P450 de la famille 3A par le récepteur PXR et plus précisément par la formation de l'hétérodimère PXR-RXR. En effet, Pascussi *et al.*, (1999) ont montré qu'un élément de réponse aux récepteurs des pregnanes était présent dans le promoteur du gène du CYP3A7. Il semblerait que le récepteur des glucocorticoïdes soit également impliqué dans la régulation des cytochromes P450 de la famille 3A (Pascussi *et al.*, 2000(a)) mais rien n'est décrit pour le CYP3A7. En revanche, un élément de réponse pour le récepteur CAR a été trouvé en amont du promoteur du gène de CYP3A7 (Bertilsson *et al.*, 2001)

Saito *et al.*, (2001) ont montré que l'expression du CYP3A7 dans les cellules HepG2 était régulé par Sp1, Sp3, le facteur nucléaire des hépatocytes  $\beta$ 3 et le facteur stimulateur 1.

### **1.2.6. Le cytochrome P450 4A11.**

Les cytochromes P450 de la famille 4A sont inductibles par les proliférateurs de peroxisomes (Johnson *et al.*, 2002), par la DHEA chez le rat (Ripp *et al.*, 2002), par l'éthanol et le clofibrate dans les microsomes de foie humain et de rat (Adas *et al.*, 1998). L'activité des cytochromes P450 de la famille 4A est augmentée en présence de Lipopolysaccharide (LPS) (Warren *et al.*, 2001).

Les cytochromes P450 de la famille 4A sont régulés négativement par la triiodothyronine (Singleton *et al.*, 1999). Les interleukine-1 $\beta$  et interleukine-6 diminuent l'activité et le taux d'ARNm de CYP4A1 dans les hépatocytes de rat (Parmentier *et al.*, 1993 ; Parmentier *et al.*, 1997). Le CYP4A11 est également inhibé par le resveratrol et l'epsilon-viniferin (Piver *et al.*, 2003).

La protéine récepteur responsable de l'induction des CYP4A a été clonée en 1990 et est appelée PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (Issemann et Green, 1990). Palmer *et al.*, (1994) ont montré la présence d'un élément de réponse aux composés chimiques proliférateurs de peroxisomes (PPC) dans la région 5' flanquante du gène des CYP4A. Le PPAR $\alpha$  forme un hétérodimère avec le récepteur RXR et sert d'activateur de la transcription du gène CYP4A en réponse aux PPC ou aux ligands endogènes d'acides gras.

Une séquence DR1 est nécessaire mais pas suffisante pour une liaison spécifique et transactivatrice de PPAR-RXR, celle-ci nécessite également un demi-site 1 localisé dans la région 5' flanquante immédiate de DR1 (Chang *et al.*, 1993). Le demi-site 1 favorise la liaison spécifique de PPAR $\alpha$ -RXR en diminuant la liaison des homodimères RXR et d'autres complexes de récepteurs nucléaires compétiteurs possédant une spécificité pour la séquence DR1 (Chang *et al.*, 1993).

## **1.2.7. Les cytochromes P450 de la famille 4F.**

### **1.2.7.1. Le cytochrome P450 4F2.**

Certains auteurs (Zhang *et al.*, 2000(a) et 2000(b)) ont montré que le gène du cytochrome P450 4F2 répond à l'acide rétinoïque par l'élément DR1-RARE (*Retinoid Acid Respons Element*) présent à la position -708 et capable de lier les hétérodimères RXR $\alpha$ /RAR $\alpha$ . Ces études indiquent que l'acide rétinoïque peut d'une part réguler l'activité du gène du cytochrome P450 4F2 par l'intermédiaire de l'hétérodimère RXR $\alpha$  et d'autre part réprimer l'expression de ce cytochrome P450 avec le récepteur RAR $\alpha$  (Zhang *et al.*, 2000(a) ; Zhang *et al.*, 2000(b)).

### **1.2.7.2. Le cytochrome 4F12.**

Il n'y a actuellement aucune information disponible dans la littérature concernant la régulation de ce cytochrome P450.

## **1.2.8. Le cytochrome 5A1.**

L'expression de ce cytochrome P450 semble être modulée par de nombreux facteurs incluant des éléments en cis, des trans-activateurs et probablement une méthylation génomique (ref) Mais aucune étude ne mentionne l'implication de récepteurs nucléaires.

## **2. Les statines.**

### **2.1. Définition.**

Parmi les molécules impliquées dans la régulation des cytochromes P450, les statines occupent depuis ces dernières années une place importante. Les inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A réductase (les statines) sont des inhibiteurs potentiels de la biosynthèse du cholestérol et sont utilisés dans le traitement de l'hypercholestérolémie (Corsini et al., 1999). Des essais cliniques réalisés sur l'utilisation des statines démontrent l'implication de ces molécules dans les pathologies coronaires et cardiovasculaires en général (Sacks *et al.*, 1996 ; Shepherd *et al.*, 1995).

### **2.2. Les effets pleiotropiques.**

Des études récentes suggèrent que les effets bénéfiques des statines au niveau clinique pourrait impliquer des mécanismes non lipidiques qui affectent la fonction endothéliale, les cellules musculaires lisses et les macrophages, la fonction vasomotrice, la réponse inflammatoire et la stabilité de la plaque athéromateuse (Bellosta et al., 1998 ; Vaughan et al., 1996).

#### **2.2.1. Statines et prolifération cellulaire.**

Les statines jouent également un rôle dans l'induction et la migration cellulaire des cellules endothéliales et musculaires lisses. Ainsi, Les statines lipophiles telles que l'atorvastatine, la fluvastatine et la lovastatine provoquent l'apoptose des cellules musculaires lisses vasculaires. Raiteri *et al.*, (1997) ont démontré que la simvastatine, la cérivastatine et la fluvastatine diminuent de façon dose-dépendante la prolifération des cellules musculaires lisses indépendamment de leur capacité à réduire les taux plasmatiques de cholestérol. La fluvastatine induit l'apoptose dans les cellules endothéliales Ea.hy926 (Newton *et al.*, 2003).

Certaines statines ont également des effets sur d'autres cellules endothéliales (Negre-Aminou *et al.*, 1997 ; Vincent *et al.*, 2002) et sur la prolifération des monocytes artériels en culture (Bellosta *et al.*, 2000).

### **2.2.2. Statines et tonus vasculaire.**

Il a été démontré chez les patients atteints d'hypercholestérolémie sévère que les statines améliorent les propriétés vasodilatatrices de l'endothélium. Le monoxyde d'azote (NO) est un médiateur clé du tonus vasculaire. Dans les cellules endothéliales en culture, l'inhibition de la NO synthase par les LDL oxydées est levée par l'atorvastatine, qui restaure des niveaux normaux d'ARNm de la protéine en les stabilisant (Hernandez-Perera *et al.*, 1998). Ces résultats concordent avec ceux obtenus *in vivo*, où la biodisponibilité du NO, abaissée chez les sujets hypercholestérolémiques, est rétablie par un traitement à base de statines (John *et al.*, 1998). Un mécanisme complémentaire d'action des statines contribuerait à augmenter la biodisponibilité du NO, via une inhibition de la production de l'anion superoxyde produit par la NADPH oxydase. Les statines, en empêchant l'induction de cette enzyme par les LDL oxydées, réduiraient la production d'anion superoxyde et de ce fait, l'inactivation du NO (Rueckschloss *et al.*, 2001).

Dans les artères coronaires des patients atteints d'athérosclérose, la baisse du cholestérol par la pravastatine ou la lovastatine améliore la fonction endothéliale en limitant la vasoconstriction induite par l'acétylcholine (Anderson *et al.*, 1995 ; Treasure *et al.*, 1995). Raiteri *et al.*, (1997) ont démontré que la simvastatine, la cérivastatine et la fluvastatine diminuent de façon dose-dépendante la prolifération des cellules musculaires lisses indépendamment de leur capacité à réduire les taux plasmatiques de cholestérol.

Enfin, les statines diminuent la vasoconstriction en réduisant la production d'endothéline par l'intermédiaire d'une baisse significative des niveaux de l'ARNm du précurseur de l'endothéline (Hernandez-Perera *et al.*, 2000).

Toutes ces données décrivent le rôle important des statines dans la régulation du tonus vasculaire, ce qui leur confère un rôle majeur dans les pathologies cardiovasculaires.

### **2.2.3. Statines et inflammation.**

Il a été démontré que les taux plasmatiques des marqueurs des pathologies cardiovasculaires (Ridker *et al.*, 1998) tels que les interleukines 6 ou 8 et la CRP pourraient être diminués par certaines statines (Terkeltaub *et al.*, 1994 ; Ridker *et al.*, 1998 ; Stranberg *et al.*, 1999). Par exemple la simvastatine et l'atorvastatine diminuent les taux d'interleukine-1 dans les hépatocytes humains (Kleemann *et al.*, 2004). Les statines sont également capables de réduire les taux de certaines molécules d'adhésion impliquées dans les réactions inflammatoires (Pate *et al.*, 2003).

### **2.3. Les statines et les acides gras.**

Il a été démontré que les acides gras essentiels avaient des propriétés similaires aux statines (Proksch *et al.*, 1992 ; Rise *et al.*, 2001). De plus, Das, (2001) a suggéré que les acides gras essentiels et leurs métabolites peuvent servir de seconds messagers à l'action des statines. Récemment, il a été observé que les statines (lovastatine, simvastatine et mévastatine) stimulent la libération d'un acide gras essentiel : l'acide arachidonique et stimule la production de son métabolite le PGI<sub>2</sub> ayant des propriétés vasodilatatrices (Levine *et al.*, 2003).

De façon générale, de nombreux gènes importants pour les fonctions vasculaires sont affectés par les statines, on peut citer par exemple les gènes eNOS (Laufs *et al.*, 1998), ET-1, l'activateur du plasminogène de type 1 dont l'expression est modifiée dans les cellules endothéliales, musculaires lisses et les cellules HepG2 (Morikawa *et al.*, 2004).

Toutes ces études décrivent l'importance des statines notamment leurs effets pleiotropiques dans la régulation des différentes fonctions cellulaires et plus particulièrement au niveau vasculaire.



## **V. Polymorphisme génétique des cytochromes P450 et pathologie cardiovasculaire.**

### **1. Généralités.**

De nombreuses différences inter-individuelles et inter-ethniques dans l'effet des médicaments sont attribuées à des différences génétiques dans leur métabolisme. Les cytochromes P450 humains sont très polymorphes ([www.imm.ki/CYPalleles](http://www.imm.ki/CYPalleles)). Certaines de ces variations génétiques s'expriment dans des protéines d'activité enzymatique différente. Les polymorphismes génétiques des cytochromes P450 sont d'abord connus comme la cause de réactions de biotransformation particulières des médicaments (Romkes *et al.*, 1991). En effet, si certaines mutations dites silencieuses n'ont pas de conséquences particulières en revanche, lorsqu'il s'agit de mutations responsables de modification de l'activité enzymatique, ces dernières peuvent avoir de nombreuses conséquences notamment lors de l'administration d'un médicament métabolisé par ces enzymes polymorphiques. Si un allèle mutant présente une fréquence d'au moins 1% et produit différentes réponses aux médicaments, ce phénomène est appelé polymorphisme génétique.

Le polymorphisme des gènes des enzymes métabolisant les xénobiotiques sont largement responsables des différences inter-individuelles au niveau de l'activation et de la détoxification des agents génotoxiques et peuvent influencer la susceptibilité des individus aux cancers environnementaux (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). En effet, une étude récente a montré que la prédisposition des individus au cancer est modifiée par le génotype des enzymes impliquées dans l'activation ou la détoxification de carcinogènes présents dans le tabac et la réparation des dommages à l'ADN (Bartsch *et al.*, 2000).

Nous avons décrit précédemment les cytochromes P450 impliqués dans la production de métabolites vaso-actifs à partir de l'acide arachidonique. Ces cytochromes P450 étant polymorphes, il est probable que les différents variants aient des activités métaboliques différentes et que les quantités de métabolites vaso-actifs produits soient variables. Il pourrait alors exister un lien entre la présence de certains variants et le risque accru d'apparition de pathologie vasculaire, par exemple l'hypertension ou des pathologies à composante inflammatoire liées à la présence de certains métabolites de l'acide arachidonique. Ce chapitre a pour but de dresser un inventaire des polymorphismes des principaux cytochromes P450 humains et d'examiner les conséquences éventuelles de ces polymorphismes sur le métabolisme de l'acide arachidonique et sur le risque cardiovasculaire.

De part leur localisation et les métabolites qu'ils forment, il est en effet possible que ces cytochromes P450 jouent un rôle en physiopathologie cardiovasculaire. C'est pourquoi, il nous paraît utile de privilégier l'étude de leur polymorphisme en pathologie cardiovasculaire.

## **2. Polymorphisme des cytochromes P450.**

### **2.1. Le cytochrome P450 1A1.**

Chez l'homme, CYP1A1 est localisé sur le chromosome 15 (15q22-q24), 8 allèles sont connus et répertoriés dans les banques de données. Le polymorphisme de CYP1A1 affecte l'inductibilité de CYP1A1 par les hydrocarbures polycycliques (fumée, produits de combustion, dioxine) (Cosma *et al.*, 1993). De nombreuses publications associent le polymorphisme de CYP1A1 avec le risque de cancer. Ainsi le polymorphisme du cytochrome 1A1 est impliqué dans les cancers du poumon, du sein, du pancréas, de l'appareil digestif mais également dans certaines leucémies. Récemment, le polymorphisme CYP1A1 Msp1 situé dans la région 3' flanquante du gène a été associé au cancer dû à la fumée de tabac et pourrait également être associé aux maladies cardiovasculaires notamment au diabète de type 2. Le polymorphisme CYP1A1 Msp1 consiste en un changement de base T6235C. Dans la population européenne, la fréquence allèle de l'allèle rare C est de 11 % (Wang *et al.*, 2002c ; Wang *et al.*, 2003b).

### **2.2. Le cytochrome P450 1B1.**

Il existe un grand nombre de mutations dans les régions codantes de CYP1B1. Les banques de données (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>) indiquent 25 mutations (Stoilov *et al.*, 1997 ; Kakiuchi-Matsumoto *et al.*, 2001, Aklillu *et al.*, 2002). Outre le glaucome congénital, les polymorphismes de CYP1B1 pourraient jouer un rôle dans les cancers hormono-dépendants tels que le cancer de la prostate (Tang *et al.*, 2000 ; Chang *et al.*, 2003) et le cancer du sein (Kristensen *et al.*, 2000).

## **2.3. Les cytochromes P450 de la famille 2C.**

### **2.3.1. Le cytochrome P450 2C8.**

Le cytochrome P450 2C8 présente 4 formes : CYP2C8\*2, CYP2C8\*3 (Dai *et al.*, 2001), CYP2C8\*4 (Bahadur *et al.*, 2002) et CYP2C8\*5 (Soyama *et al.*, 2002). L'allèle muté CYP2C8\*2 correspond à un changement nucléotidique 805A>T dans l'exon 5 qui produit une substitution Ile269Phe, l'allèle muté CYP2C8\*3 correspond quant à lui à des changements nucléotidiques 416G>A et 1196A>G dans les exons 3 et 8 ce qui provoque deux substitutions Arg139Lys et Lys399Arg. L'allèle CYP2C8\*2 est trouvé à une fréquence allélique de 18% chez des américains d'origine africaine et l'allèle CYP2C8\*3 est trouvé à une fréquence allélique de 13% dans une population européenne. L'allèle muté CYP2C8\*2 présente une affinité plus faible pour le substrat paclitaxel alors que l'allèle muté CYP2C8\*3 diminue l'activité de l'enzyme CYP2C8 *in vitro* vis-à-vis de deux substrats importants, le paclitaxel et l'acide arachidonique (Dai *et al.*, 2001). Cette étude laisse supposer que la protéine codée par l'allèle muté CYP2C8\*3 produit une quantité moindre d'EETs, métabolites de l'acide arachidonique. Le changement nucléotidique 792C>A est trouvé dans l'allèle muté CYP2C8\*4, il entraîne une substitution d'acide aminé Ile 294Met. Cet allèle est trouvé à une fréquence de 7,5% dans une population européenne. Aucune différence d'activité métabolique n'est décrite pour cet allèle (Bahadur *et al.*, 2002). Enfin, Soyama *et al.* (2002) ont décrit une cinquième mutation (CYP2C8\*5) correspondant à une délétion d'une base A en position 475, ce qui produit une enzyme inactive.

### **2.3.2. Le cytochrome P450 2C9.**

A l'heure actuelle, 11 polymorphismes sont décrits pour le CYP2C9 (Rettie *et al.*, 1994 ; Sullivan-Klose *et al.*, 1996 ; Imai *et al.*, 2000 ; Dickmann *et al.*, 2001 ; Kidd *et al.*, 2001 ; Goldstein, 2002). Les différents polymorphismes du CYP2C9 sont présentés dans le tableau 2. La plupart de ces polymorphismes sont le résultat de changements nucléotidiques produisant des enzymes inactives *in vivo* (CYP2C9\*6) (Kidd *et al.*, 2001), des activités enzymatiques diminuées *in vivo* (CYP2C9\*3) (Sullivan-Klose *et al.*, 1996) et *in vitro* (CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, CYP2C9\*5) (Rettie *et al.*, 1994 ; Sullivan-Klose *et al.*, 1996 ; Dickmann *et al.*, 2001). L'allèle CYP2C9\*3 semble être le principal responsable de l'apparition de métaboliseurs lents du tolbutamide (Sullivan-Klose *et al.*, 1996).

CYP2C9 est capable de produire des EETs à partir de l'acide arachidonique (Daikh *et al.*, 1994). Il est possible que les allèles mutés CYP2C9\*2 et CYP2C9\*3 produisent des enzymes peu actives dans le métabolisme de l'acide arachidonique et par conséquent des quantités plus faibles d'EETs.

Une étude portant sur 1172 patients atteints d'infarctus du myocarde (Yasar *et al.*, 2003) et 1503 sujets indemnes participant au *Stockholm Heart Epidemiology Program*, montre que le risque d'infarctus chez les femmes porteuses de l'allèle muté CYP2C9\*2 ou CYP2C9\*3 et chez tous les patients, hommes et femmes, porteurs de l'allèle CYP2C8\*3 était plus élevé comparé aux porteurs des allèles fréquents CYP2C8\*1 et CYP2C9\*1. Les auteurs suggèrent que l'augmentation du risque d'infarctus du myocarde pourrait être dû à des effets vasoconstricteurs plus importants résultants d'une modification dans la production de métabolites vasorégulateurs.

Allèle	Changement nucléotidique	Effet	Activité enzymatique	Références
CYP2C9*1	Aucun		Normale	Romkes <i>et al.</i> , 1991
CYP2C9*2	430C>T	R144C	Diminuée <i>in vitro</i>	Rettie <i>et al.</i> , 1994
CYP2C9*3	1075A>C	I359L	Diminuée <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	Sullivan-Klose <i>et al.</i> , 1996
CYP2C9*4	1076T>C	I359T		Imai <i>et al.</i> , 2000
CYP2C9*5	1080C>G	D360E	Diminuée <i>in vitro</i>	Dickmann <i>et al.</i> , 2001
CYP2C9*6	818delA	changement du cadre de lecture	Aucune	Kidd <i>et al.</i> , 2001
CYP2C9*7		L19I		Goldstein <i>et al.</i> , 2002
CYP2C9*8		R150H		Goldstein <i>et al.</i> , 2002

CYP2C9*9		H251R		Goldstein <i>et al.</i> , 2002
CYP2C9*10		E272G		Goldstein <i>et al.</i> , 2002
CYP2C9*11	1003C>T	R335W		Goldstein <i>et al.</i> , 2002
CYP2C9*12		P489S		Goldstein <i>et al.</i> , 2002

**Tableau 2** : Polymorphismes de CYP2C9 d'après les bases de données internet (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles> (30/04/04)).

### 2.3.3. Le cytochrome P450 2C18.

Peu d'études décrivent les polymorphismes de CYP2C18. Des polymorphismes de CYP2C18 ont été décrits dans les populations japonaises et européennes. CYP2C18m1 correspondant à une substitution T204A dans l'exon 2 produit un codon stop prématuré (Komai *et al.*, 1996 ; Kubota *et al.*, 1998). Cet allèle muté CYP2C18m1 est présent à une fréquence de 14,6% dans la population japonaise étudiée. L'allèle muté CYP2C18mFR, présent à une fréquence allélique de 31,2% dans la même population, correspond à une substitution A460T dans la région 5' flanquante (Tsuneoka *et al.*, 1996 ; Kubota *et al.*, 1998). Ces deux allèles mutés CYP2C18m1 et CYP2C18mFR semblent coïncider avec les allèles mutés CYP2C1\*92 et CYP2C19\*3 (Kubota *et al.*, 1998 ; Inoue *et al.*, 1998 ; Mizugaki *et al.*, 2000). Deux autres variants ont été trouvés : Thr385Met qui présente une activité catalytique plus faible vis-à-vis du cyclophosphamide, ainsi que le remplacement Phe219Leu pour lequel aucune étude d'activité enzymatique n'a été réalisée (Furuya *et al.*, 1991).

### 2.3.4. Le cytochrome P450 2C19.

CYP2C19 est un gène très polymorphe qui présente au moins 19 variants alléliques (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>). La plupart de ces polymorphismes affectent le métabolisme de nombreux médicaments dont la méphénytoïne (Goldstein, 2001). La première description d'altération du métabolisme a été publiée par de Morais *et al.*, (1994a, 1994b). le génotype « défectueux » dans la population dite « caucasienne » est appelé CYP2C19\*2 et comporte deux variants alléliques CYP2C19\*2A et CYP2C19\*2B. Ces deux variants consistent principalement mais pas seulement, dans la mutation d'une paire de base dans l'exon 5 (681G>A). Cette mutation est suffisante pour créer un site de splicing aberrant, ce

qui conduit à une protéine tronquée, non fonctionnelle, qui ne possède pas la région de fixation de l'hème et par conséquent ne possède pas d'activité catalytique envers quelque substrat que ce soit (de Morais *et al.*, 1994 a; Ibeanu *et al.*, 1998 ; Goldstein *et al.*, 2001). L'allèle muté CYP2C19\*2A est présent à raison de 11% dans la population dite « caucasienne » et à raison de 59 % dans la population japonaise (de Morais *et al.*, 1994b). L'allèle muté CYP2C19\*2B est présent dans 2% de la population dite « caucasienne » (de Morais *et al.*, 1994b).

CYP2C19 est exprimé quasi exclusivement dans le foie et est au plus à la limite de détection dans les tissus vasculaires (Thum et Borlak, 2004).

Allèle	Changements nucléotidiques	Effet	Activité enzymatique	References
<i>CYP2C19*1A</i>	None	I331V	Normale	Romkes <i>et al</i> , 1991
<i>CYP2C19*1B</i>	99C>T; 991A>G	I331V	Normale	Richardson <i>et al</i> , 1997
<i>CYP2C19*1C</i>	991A>G	défaut d'épissage	Normale	Blaisdell <i>et al</i> , 2002
<i>CYP2C19*2A</i>	99C>T; 681G>A; 990C>T; 991A>G	défaut d'épissage E92D	Aucune	de Morais <i>et al</i> , 1994a
<i>CYP2C19*2B</i>	99C>T; 276G>C; 681G>A; 990C>T; 991A>G	codon stop	Aucune	Ibeanu <i>et al</i> , 1998b
<b>CYP2C19*3</b>	636G>A; 991A>G; 1251A>C	GTG codon d'initiation	Aucune	de Morais <i>et al</i> , 1994b
<i>CYP2C19*4</i>	1A>G; 99C>T; 991A>G	R433W	Aucune	Ferguson <i>et al</i> , 1998
<i>CYP2C19*5A</i>	1297C>T	I331V; R433W	Aucune	Xiao <i>et al</i> , 1997 Ibeanu <i>et al</i> , 1998a
<i>CYP2C19*5B</i>	99C>T; 991A>G; 1297C>T	R132Q; I331V	Aucune	Ibeanu <i>et al</i> , 1998a
<i>CYP2C19*6</i>	99C>T; 395G>A; 991A>G	défaut d'épissage	Aucune	Ibeanu <i>et al</i> , 1998b
<i>CYP2C19*7</i>	IVS5+2T>A	W120R	Aucune	Ibeanu <i>et al</i> , 1999
<i>CYP2C19*8</i>	358T>C	R144H; I331V	Aucune	Ibeanu <i>et al</i> , 1999
<i>CYP2C19*9</i>	99C>T; 431G>A; 991A>G	P227L; I331V	Diminuée in vitro	Blaisdell <i>et al</i> , 2002
<i>CYP2C19*10</i>	99C>T; 680C>T; 991A>G	R150H; I331V	Diminuée in vitro	Blaisdell <i>et al</i> , 2002
<i>CYP2C19*11</i>	99C>T; 449G>A; 991A>G	I331V; X491C; 26 extra aa		Blaisdell <i>et al</i> , 2002
<i>CYP2C19*12</i>	99C>T; 991A>G; 1473A>C	I331V; R410C	Instable	Blaisdell <i>et al</i> , 2002
<i>CYP2C19*13</i>	991A>G; 1228C>T	L17P; I331V		Blaisdell <i>et al</i> , 2002
<i>CYP2C19*14</i>	50T>C; 99C>T; 991A>G	I19L; I331V		Blaisdell <i>et al</i> , 2002
<i>CYP2C19*15</i>	55A>C; 991A>G;			Blaisdell <i>et al</i> , 2002

**Tableau 3** : Polymorphismes de *CYP2C19* d'après les bases de données internet (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>) (30/04/04).

## 2.4. Le cytochrome P450 2E1.

13 allèles différents ont été décrits à propos du cytochrome P450 2E1. Seuls les allèles mutés *CYP2E1\*1D* et *CYP2E1\*2* provoquent des changements d'activité enzymatique. Ainsi,

l'allèle muté CYP2E1\*1D comportant 8 répétitions de 42 à 60 paires de bases dans la région 5' flanquante du gène provoque une augmentation de l'activité enzymatique après exposition à l'alcool. Cet allèle est présent chez 1% de la population dite caucasienne et chez 23% de la population chinoise (Hu *et al.*, 1999). L'allèle muté CYP2E1\*2 comportant une mutation 1168G>A dans l'exon 2 provoquant un changement d'acide aminé Arg76His présente une diminution de l'activité enzymatique (Hu *et al.*, 1997).

La plupart des autres polymorphismes décrits pour les cytochrome P450 2E1 ont des conséquences sur la survenue de certains cancers, notamment le cancer colorectal (Kiss *et al.*, 2000), les cancers de l'appareil digestif, liés à la consommation d'alcool (Bouchardy *et al.*, 2000 ; Nishimoto *et al.*, 2000 ; Wong *et al.*, 2000) et les cancers du poumon (Wang *et al.*, 1999). Ainsi, l'allèle muté CYP2E1\*5 appelé aussi CYP2E1 Rsa 1 augmente la probabilité d'apparition d'un cancer aérodigestif supérieur (Bouchardy *et al.*, 2000), l'allèle muté CYP2E1\*5 serait également impliqué dans le cancer colorectal (Kiss *et al.*, 2000). Il a également été démontré que l'allèle muté CYP2E1\*5 (Rsa I) pourrait contribuer au développement du cancer du poumon dans la population taiwanaise (Wang *et al.*, 1999). En revanche, Nishimoto *et al.*, (2000) ont démontré que l'allèle CYP2E1\*5 (Rsa1) serait associé à une diminution du risque de cancer gastrique. L'allèle CYP2E1\*1B appelé également CYP2E1 Taq I serait liée à une diminution du risque de maladie hépatique due à la consommation d'alcool (Wong *et al.*, 2000).

## **2.5. Le cytochrome P450 2J2.**

Six variants résultants de changements nucléotidiques ont été décrits à propos de CYP2J2. Il s'agit des mutations : Thr143Ala (CYP2J2\*2), Arg158Cys (CYP2J2\*3), Ile192Asn (CYP2J2\*4), Asp342Asn (CYP2J2\*5) et Asn404Tyr (CYP2J2\*6). Le variant CYP2J2\*6 n'est trouvé que dans les populations blanches étudiées, les allèles mutés CYP2J2\*3 (2%), CYP2J2\*4 (4%), CYP2J2\*5 (2%) sont détectés uniquement dans une population africaine. Une réduction du métabolisme de l'acide arachidonique et de l'acide linoléique est observé pour les variants CYP2J2\*2 et CYP2J2\*3. CYP2J2\*6 est inactif dans le métabolisme de l'acide arachidonique et de l'acide linoléique. La mutation CYP2J2\*4 produit uniquement une réduction du métabolisme de l'acide arachidonique. Par conséquent la production de métabolites vaso-actifs tels que les EETs et les HETEs se trouve modifiée



chez les individus porteurs de ces allèles mutés pouvant provoquer une modification du tonus vasculaire. La mutation CYP2J2\*5 (Asp342Asn) ne présente pas de modification du métabolisme de ces deux acides gras (King *et al.*, 2002).

## **2.6. Les cytochromes P450 de la famille 3A.**

### **2.6.1. Le cytochrome P450 3A4.**

Le cytochrome P450 3A4 est localisé sur le chromosome 7 (7q22.1), quatre polymorphismes dont l'un affecte l'activité catalytique ont été décrits (Sata *et al.*, 2000) (CYP3A4\*2, S222P ; CYP3A4\*3, M445T). Un polymorphisme portant sur un seul changement nucléotidique (290 A>G) dans le promoteur de CYP3A4 correspondant à l'allèle CYP3A4\*B1, est associé à une sévérité plus grande des tumeurs de la prostate (Rebbeck *et al.*, 1998) et à l'apparition de leucémies secondaires à des chimiothérapies (Felix *et al.*, 1998). Cet allèle est présent chez 4 à 9% des américains d'origine européenne et chez 55% des américains d'origine africaine (Wandel *et al.*, 2000). Certains auteurs n'ont pas observé d'effet de ce polymorphisme sur l'activité de ce cytochrome P450 (Ball *et al.*, 1999 ; Westlind *et al.*, 1999), d'autres observent une activité (midazolam oxydase) plus faible due à cette mutation chez les homozygotes G/G (Wandel *et al.*, 2000). Trois autres polymorphismes ont été découverts plus récemment: CYP3A4\*4 correspondant au changement nucléotidique (352 A>G) (Ile 118 val), CYP3A4\*5 pour le changement nucléotidique 653 C>G (Pro218 arg) et CYP3A4\*6 correspondant à l'insertion d'une base A à la position 831. Ces polymorphismes diminueraient l'activité d'hydroxylation du cortisol en 6 $\beta$  (Hsieh *et al.*, 2001). De plus, 7 autres allèles sont décrits par Eiselt *et al.*, (2001) dont CYP3A4\*11 qui entraîne une diminution de la quantité de protéine et CYP3A4\*12 qui provoque une diminution de l'activité de la protéine CYP3A4 vis-à-vis de la testostérone. Les autres allèles n'ont pas de conséquence sur l'expression et l'activité de CYP3A4. Trois allèles ont été décrits par Lamba *et al.*, (2002), ces polymorphismes n'ont pas de conséquence sur l'expression et l'activité de CYP3A4. Très récemment, 14 nouveaux polymorphismes de CYP3A4 ont été observés dans une population japonaise. Ces mutations sont situées dans la région *enhancer*, dans le promoteur et dans les régions 3' et 5' non transcrites du gène (Fukushima-Uesaka *et al.*, 2004). Le SNP le plus fréquent (25%) trouvé dans une population japonaise est la mutation 20230G>A retrouvé dans les allèles mutés CYP3A4\*16B et

CYP3A4\*18. Actuellement aucune information n'est connue sur l'effet de ces mutation vis-à-vis de l'activité de la protéine CYP3A4. Un autre polymorphisme a également été décrit dans la région *enhancer* de CYP3A4. Ce nouveau polymorphisme correspond à une insertion de trois bases TGT aux positions -11129 et -11128. Cette insertion serait responsable d'un défaut de liaison de la protéine USF1, ayant pour conséquence une diminution de 36% de l'activité enzymatique de CYP3A4. Cet allèle muté est présent chez 3 % de la population française étudiée (Matsumura *et al.*, 2004).

### **2.6.2. Le cytochrome P450 3A5.**

Actuellement, 22 polymorphismes sont décrits pour le cytochrome P450 3A5 (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>). Jounaidi *et al.* (1996) ont détecté un variant allélique de CYP3A5, porteur d'une mutation ponctuelle 1280C>A provoquant un changement d'acide aminé Thr398Asn qui entraîne la diminution de la quantité de protéine. Yamakoshi *et al.* (1999) ont isolé un clone particulier à la prostate, toutefois, l'effet de cet allèle muté sur le cancer de la prostate n'a pas été examiné. Paulussen *et al.* (2000) ont observé deux polymorphismes associés : -369T/G et -45A/G dans la partie régulatrice qui augmentent l'expression et l'activité midazolam oxydase de la protéine CYP3A5. Chou *et al.* (2001) ont décrit un polymorphisme 599 A>G (CYP3A5\*4) et un défaut d'épissage (CYP3A5\*5). Ces mutations sont trouvées chez 1% de la population chinoise étudiée. L'effet de ces deux mutations sur l'activité de CYP3A5 n'est pas encore connu.

Les polymorphismes CYP3A5\*2 et CYP3A5\*6 présentant un simple changement nucléotidique provoquent un épissage alternatif différent et une protéine tronquée ayant pour conséquence l'absence de la protéine CYP3A5 dans les tissus de certains patients (Kuehl *et al.*, 2001).

Une étude récente a démontré une association entre l'allèle muté 6986A>G et la pression sanguine systolique. Cet allèle est présent chez 25 américains d'origine africaine. Une sensibilité plus importante à l'hypertension pourrait être observée chez les individus porteurs de cette mutation (Givens *et al.*, 2003).

### **2.6.3. Le cytochrome P450 3A7.**

CYP3A7 est la forme spécifique retrouvée chez l'embryon et dans les hépatomes. A l'heure actuelle, il existe deux polymorphismes décrits de CYP3A7 : CYP3A7\*1B et CYP3A7\*1C. CYP3A7\*1C est présent dans le foie et l'intestin humain alors que le CYP3A7\*1B n'a été trouvé que dans le foie humain (Burk *et al.*, 2002).

## **2.7. Le cytochrome P450 4A11.**

Les explorations génétiques de CYP4A ne sont qu'à leur début. Des manipulations génétiques de *cyp4a10* chez la souris modifient la synthèse et l'excrétion urinaire des EETs qui sont anti-hypertenseurs et conduisent au développement d'une hypertension rénale sensible au sel. Toujours chez les souris, l'extinction du gène *cyp4a14* entraîne une up-régulation du gène *cyp4a12*, une augmentation de synthèse du 20-HETE et une vasoconstriction rénale et finalement une hypertension androgène dépendante (Capdevila et Falck, 2001 ; Holla *et al.*, 2001). Chez les humains, CYP4A11 est exprimé dans les reins et catalyse l'hydroxylation de l'acide arachidonique en 20-HETE. Il pourrait avoir un rôle dans la physiopathologie de l'hypertension. Des résultats préliminaires ont été rapportés par JH. Capdevila (Prague, 2003) indiquant que CYP4A11 présentait une vingtaine de variants et que la fréquence allélique de l'un d'entre eux (F434S) serait significativement différente chez les hypertendus, avec des différences phénotypiques dans la 20-hydroxylation de l'acide laurique et de l'acide arachidonique.

## **2.8. Les cytochromes P450 de la famille 4F.**

### **2.8.1. Le cytochrome P450 4F2.**

A l'heure actuelle, aucun polymorphisme de CYP4F2 n'a été décrit.

### **2.8.2. Le cytochrome P450 4F12.**

Bylund *et al.* (2001) ont montré qu'il existe un variant allélique de CYP4F12 , ce dernier concerne une simple substitution nucléotidique (38C>T) ce qui produit un changement d'acide aminé : une leucine en position 13 à la place d'une proline. Cette mutation n'a que peu d'effet sur les propriétés catalytiques de CYP4F12.

## **2.9. Le cytochrome P450 5A1.**

Onze polymorphismes ont été identifiés dans le gène du CYP5A1 incluant 8 mutations non sens R61H, D161E, N246S, L357V, Q417E, E450K, T451N et R466Q. L'effet de ces variants sur l'activité métabolique du CYP5A1 reste à élucider (Chevalier *et al.*, 2001).

## **2.10. Le cytochrome P450 8A1.**

Au niveau moléculaire, il a été établi que les variations de la séquence de 8A1 peuvent affecter l'activité de celui-ci. Un polymorphisme génétique a été observé dans les familles japonaises présentant une hypertension essentielle et ayant eu une attaque cérébrale (Nakayama *et al.*, 1997). Plus récemment, Iwai *et al.* (1999) ont identifié dans une population japonaise un nombre variable de répétitions en tandem (VNTR) dans la région 5' flanquante du CYP8A1. Cette mutation affecte de façon significative l'activité de l'enzyme après stimulation par de l'interleukine 6 et peut être un facteur de risque pour l'hypertension systolique.

En résumé, les polymorphismes des cytochromes P450 des familles 2C, plus particulièrement les polymorphismes des cytochromes P450 2C8, 2C9 et 2C19 pourraient jouer un rôle dans les modifications de métabolisme de l'acide arachidonique et par conséquent dans la production de métabolites vaso-actifs pouvant provoquer des modifications du tonus vasculaire. Par ailleurs, les polymorphismes des cytochromes P450 2J2 et 4A11 sont actuellement peu explorés mais pourraient avoir des conséquences tout aussi importantes dans la régulation du tonus vasculaire et mériteraient d'être étudiées plus en profondeur.

# **OBJECTIFS.**

Les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays développés en provoquant chaque année le décès de plus de 14 millions de personnes dans le monde. L'infarctus du myocarde, l'hypertension artérielle sont des maladies les plus impliquées dans ces décès. D'autres maladies telles que la pathologie variqueuse bien que moins décrites et moins étudiées, figurent les maladies vasculaires plus ou moins invalidantes. Les maladies veineuses chroniques des membres inférieurs ont un large spectre de manifestations cliniques qui touchent globalement plus de la moitié de la population des pays industrialisés. Les varices sont d'origine multifactorielles, liées au vieillissement, à des facteurs d'environnement et à une prédisposition familiale. Parmi les symptômes veineux, les varices, représentant seulement une partie des maladies veineuses, sont très fréquentes et touchent d'avantage la femme que l'homme.

Au niveau cellulaire, la pathologie variqueuse est caractérisée par une dérégulation de l'homéostasie vasculaire. Cette dernière se manifeste par un dérèglement de l'équilibre entre les molécules vasodilatatrices (telles que les EETs, le NO, la prostacycline) et les molécules vasoconstrictrices (telles que les HETEs, le thromboxane A2). Ces molécules sont produites par l'endothélium qui joue un rôle très important de barrière entre le sang et la paroi vasculaire. C'est un véritable organe qui sécrète les substances vaso-actives régissant le tonus et la croissance vasculaire. La plupart des molécules vaso-actives sont issues de l'acide arachidonique : les acides epoxyeicosatriénoïques (EETs), les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs), les prostaglandines et le thromboxane. Les EETs et les HETEs sont produits par les cytochromes P450 et les prostaglandines et le thromboxane A2 par les cyclooxygénases de type 1 et de type 2.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'expression et à la régulation des cytochromes P450 dans les modèles vasculaires. Ce travail s'est engagé sur plusieurs hypothèses :

- une modification de l'expression des enzymes impliquées dans la production de molécules vasoconstrictrices ou vasodilatatrices, telles que les cytochromes P450 pourrait être une cause dans la dérégulation de la production de molécules vasoactives et ainsi contribuer à la pathologie variqueuse.
- Des polymorphismes génétiques pourraient être à l'origine de modifications d'activité enzymatiques vis-à-vis de composés endogènes notamment l'acide arachidonique.

- Une modulation de l'activité de ces cytochromes P450 par différentes substances pourrait être le départ pour d'éventuels traitements.

Pour cela dans un premier temps, nous avons étudié l'expression des cytochromes P450 (CYP1B1, CYP2C, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A5, CYP4A11), des cyclooxygénases de type 1 et de type 2 et des NO synthases dans des veines saphènes saines et variqueuses.

Puis, nous avons examiné l'expression des cytochromes P450 dans des cultures primaires de veines saphènes (HSVEC). Après avoir vérifié qu'une lignée endothéliale classique exprimait les mêmes cytochromes que les cellules de veines saphènes, nous avons étudié la régulation des cytochromes de la famille 2C. Pour cela, nous avons évalué l'effet de différentes molécules sur l'expression de ces cytochromes 2C et des récepteurs nucléaires responsables de la régulation de ces cytochromes : les récepteurs CAR (Constitutive Androstane Receptor) et PXR (Pregnane X Receptor). Les molécules testées sont des statines, molécules inhibitrices de l'HMGCoA réductase. Ces molécules possèdent de nombreuses propriétés pleïotropiques vis-à-vis des maladies impliquant l'endothélium.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons observé l'influence du polymorphisme des cytochromes de la famille 2C principalement CYP2C9 et CYP2C19 sur la pathologie variqueuse. Pour cela, nous avons étudié les variations alléliques dans une population Caucasienne supposée saine issue de la Cohorte Stanislas.

# MATERIELS ET METHODES

## I. Populations étudiées.

### 1. Echantillons de veines saphènes humaines.

La collection de veines est constituée d'une part par des échantillons de veines saphènes saines provenant de patients ayant subi un pontage coronarien et d'autre part par des échantillons de veines saphènes variqueuses provenant de patients ayant subi un stripping. Ces échantillons ont pu être collectés grâce à une collaboration avec Odile Falson et Stéphanie Desquand-Billiald (Innothéra) et le Dr Jean François Renaud de la Faverie, (Hôpital Marie Lannelongue, université Paris XI, CNRS ESA8078, Le Plessis Robinson). 55 échantillons de veines saphènes humaines saines et pathologiques ont été reçus et séparés en 2 séries de 20 et une série de 15.

### 2. La Cohorte Stanislas.

La Cohorte STANISLAS (Suivi Temporaire Non Invasif de la Santé des Lorrains Assurés Sociaux) est constituée de 1006 familles nucléaires de Meurthe et Moselle et des Vosges, composées chacune de deux parents et d'au moins deux enfants âgés de plus de huit ans, se rendant régulièrement au Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre-les-Nancy pour y effectuer un bilan biologique complet (Siest *et al.*, 1998). Notre population de travail est constituée d'un échantillon de 272 familles afin d'étudier les paramètres des maladies cardiovasculaires. Pour cette étude, nous avons sélectionné une partie d'individus fumeurs (66 femmes et 99 hommes) et non fumeurs, mais également des individus sous traitement anti-hypertenseur, anti-arrhythmique ou traités par des agents vasodilatateurs ou anti-thrombotiques. Les femmes enceintes ne sont pas incluses dans notre étude.

## II. MESURE DES PARAMETRES BIOLOGIQUES.

## 1. Données médicales.

Les données telles que l'indice de masse corporel (IMC), la taille, l'âge, les antécédents pathologiques et les conclusions de l'examen médical ont été recueillies au cours de l'examen de santé pour chaque individu. Les consommations d'alcool, de tabac et de médicaments ont été évaluées à l'aide d'auto-questionnaires ou d'interrogatoires par des personnels qualifiés.

## 2. Données biologiques.

Les prélèvements sanguins ont été effectués sur les sujets à jeun depuis 12 heures. Les dosages biologiques sont réalisés sur le sérum selon des méthodes automatisées.

Les paramètres mesurés sont les suivants :

- nombre de globules blancs mesuré sur MAXM Analyseur (Beckman Coulter)
- triglycérides : méthode GPO/PAP (enzymologie sur AU5021, Olympus Merck)
- HDL-cholesterol : précipitation au phosphotungstate (Cobas Mira, Roche)
- Alcaline phosphatase mesurée par une méthode standard (Merck)
- Taux plasmatiques circulants de TNF- $\alpha$  et IL-6 : Kit ELISA commercialisé (R&D systems).
- C-reactive protein.

La pression sanguine a été mesurée avec un sphygmomanomètre dans les conditions standards (les individus sont en position allongée). Les valeurs obtenues pour les pressions sanguines systoliques et diastoliques représentent la moyenne de trois mesures. Le poids, la taille et les consommations d'alcool et de tabac sont également enregistrés à chaque visite.

## III. Culture cellulaire.

Nous avons utilisé deux types de cellules endothéliales : des cellules en culture primaire, les cellules de veines saphènes HSaVEC (*Human Saphenous Vein Endothelial Cells*) et la lignée de cellules endothéliales ECV304 (*Endothelial Cells Vascular*). Nous avons également étudié une lignée de cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) et une lignée de cellules d'hépatoblastome : les cellules HepG2 qui nous serviront de témoin.



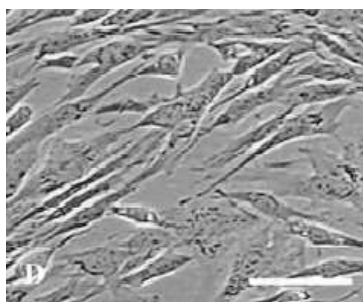
## 1. Les cellules.

Les cellules que nous avons utilisées dans ce travail sont toutes des cellules adhérentes.

### 1.1. Cellules HSaVEC.

Les cellules de veines saphènes humaines sont utilisées pour étudier les maladies cardiovasculaires et plus particulièrement les pathologies de resténose et de thrombose (Motwani et Topol, 1998). Les études réalisées sur ces cellules se font la plupart du temps sur des cellules en culture primaire. Une seule étude a été réalisée pour caractériser des lignées de cellules provenant de veines saphènes humaines (Scoumanne *et al.*, 2002). Dans ce travail, nous utiliserons des cellules en culture primaire. Nous ne réaliserons donc pas plus de 4 passages afin de garantir la non différenciation des cellules.

Les cellules HSaVEC (Promocell, Heidelberg, Allemagne, lot n°130X240300) étudiées dans ce travail sont des cellules provenant de veines saphènes humaines issues d'un seul patient. Les cellules sont représentées sur la figure 18.



**Figure 18** : Photographie de cellules HSaVEC en culture. Cette photographie a été réalisée au moyen d'un appareil photo Olympus couplé à un microscope Olympus (Rungis, France).

Les cellules sont cultivées dans du milieu de croissance endothélial (Promocell, Heidelberg, Allemagne) auquel on ajoute un supplément fourni avec le milieu. Le milieu final

contient 0.4 % d'ECGS/H (*Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin*), 2 % de sérum de veau fœtal, 0.1 ng/ml de facteur de croissance endothélial, 1 µg/ml d'hydrocortisone, 1 ng/ml de facteur basal de fibroblaste, 50 ng/ml d'amphotéricine B, 50 ng/ml de gentamicine dans une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'air à 37°C.

Les cellules sont amplifiées dans des flacons de 75 cm<sup>3</sup> de la façon suivante : le milieu est remplacé par 5 ml d'HEPES *Balance Salt Solution* (Promocell, Heidelberg, Allemagne) et les cellules sont ainsi lavées pendant 30 secondes sous une agitation légère. L'HEPES *Balance Salt Solution* est ensuite enlevée et 5 ml de trypsine EDTA 1X sont ajoutés. La trypsine est laissée 4 minutes au contact des cellules et le décollement des cellules est observé au microscope. Lorsque 50% des cellules sont détachées, agiter légèrement le flacon afin de détacher le reste des cellules. Puis, 5 ml de solution de neutralisation de la trypsine (*Trypsin neutralising solution*, Promocell, Heidelberg, Allemagne) sont ajoutés. La suspension cellulaire est placée dans un tube de 50 ml et centrifugée à 1000g pendant 4 minutes à température ambiante. Le culot est repris dans 10ml de milieu puis les cellules sontensemencées à raison de 300000 cellules par flacon.

## 1.2. Cellules ECV304.

Les cellules ECV304 ont été offertes par le Dr J.B. Dietrich (CNRS, Strasbourg, France). Les cellules ECV304 ont été caractérisées dans un premier temps comme provenant du cordon ombilical d'un nouveau né femelle asiatique, elles ont donc été assimilées à des cellules HUVEC. Ces cellules se sont transformées de façon spontanée en lignée cellulaire appelée ECV304 (Takahashi *et al.*, 1990). Toutefois, récemment, une étude a montré que les cellules ECV304 ressemblaient à des cellules provenant d'une tumeur de vessie (Brown *et al.*, 2000). Compte tenu de ces données, depuis quelques années, leur caractère de cellules endothéliales est controversé, en effet, certains auteurs les considèrent comme des cellules endothéliales (Suda *et al.*, 2001) et d'autres pas (Drexler *et al.*, 2002). Les cellules ECV304 sont représentées sur la figure 19.



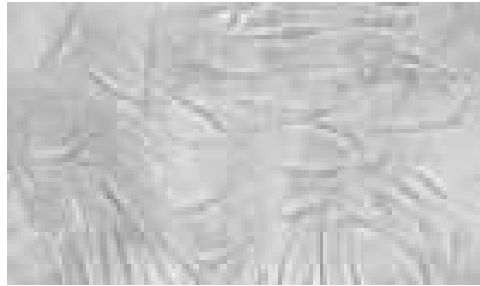
**Figure 19 :** Visualisation d'une culture de cellules ECV304. la photographie est réalisée au moyen d'un appareil photo Olympus couplé au microscope Olympus.

Les cellules ECV304 sont cultivées dans du milieu DMEM (Sigma) supplémenté de 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (BioWest, Nuaille, France), 10 U/ml de pénicilline, 0.1 mg/ml de streptomycine, 25 µg/ml d'amphotéricine B (Sigma, Saint Louis, MO, USA) dans une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'air à 37°C. Les cellules sont amplifiées tous les trois jours à raison de 1 flacon de 75 cm<sup>3</sup> dans 3 flacons de 75 cm<sup>3</sup> de la façon suivante ; les cellules sont décollées du flacon par action de 5 ml de Trypsine (Sigma) pendant 5 minutes. La solution de trypsine est alors neutralisée par ajout de 5 ml de milieu contenant du sérum de veau foetal. La suspension cellulaire ainsi obtenue est placée dans un tube de 50 ml et centrifugée pendant 5 minutes à 1000g. Le surnageant est enlevée et le culot cellulaire est repris dans quelques ml de milieu. Les cellules sont enfinensemencées dans les différents flacons de 75 cm<sup>3</sup>.

### **1.3. Cellules musculaires lisses.**

Le remodelage vasculaire est une caractéristique adaptative importante pour le maintien du flux sanguin dans les vaisseaux présentant une couche intimale plus épaisse. La prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la couche media artérielle vers la couche intimale ont été décrites dans le développement de maladies athéroscléreuses chez l'homme (Schwartz *et al.*, 1986). De plus, les cellules neointimales sont impliquées dans des processus clé de la formation de la plaque athéromateuse incluant l'accumulation de matrice extracellulaire et des dépôts de calcium (Severson *et al.*, 1995 ; Shanahan *et al.*, 1994). Les cellules musculaires lisses sont donc utilisées en grande partie pour étudier les phénomènes de remodelage vasculaire observés dans des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose mais également la pathologie variqueuse. Ces études sont réalisées sur des cellules en culture primaire ; une seule étude décrit la caractérisation des cellules musculaires lisses en lignée (Bonin *et al.*, 1999).

Dans ce travail, nous utiliserons des cellules musculaires lisses en culture primaire. Les cellules musculaires lisses ont été généreusement offertes par le Professeur J. Bonnet (INSERM U441, Bordeaux - Pessac, France). Les cellules musculaires lisses sont isolées à partir de la média d'aortes thoraciques humaines par digestion enzymatique comme décrit par Thyberg *et al.*, (1983). Les cellules sont représentées sur la figure 20.



**Figure 20 :** Visualisation d'une culture de cellules musculaires lisses. Cette photographie a été réalisée au moyen d'un appareil photo Olympus couplé à un microscope Olympus (Rungis, France).

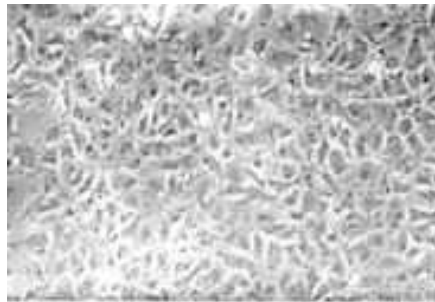
Les cellules musculaires lisses sont cultivées dans du milieu Ham's F-10 (Life Technologies, Inc) supplémenté de 5 % (v/v) de sérum de veau fœtal (BioWest), 5mM HEPES, 50 U/ml de pénicilline, 50 mg/ml de streptomycine (Sigma) dans une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'air à 37°C. Les cellules sont amplifiées tous les trois jours à raison de 1 flacon de 75 cm<sup>3</sup> dans 2 flacons de 75 cm<sup>3</sup> de la façon suivante ; les cellules sont décollées du flacon par action de 5 ml de Trypsine (Sigma) pendant 5 minutes. La solution de trypsine est alors neutralisée par ajout de 5 ml de milieu contenant du sérum de veau foetal. La suspension cellulaire ainsi obtenue est placée dans un tube de 50 ml et centrifugée pendant 5 minutes à 1000g. Le surnageant est enlevé et le culot cellulaire est repris dans quelques ml de milieu. Les cellules sont enfinensemencées dans les différents flacons de 75 cm<sup>3</sup>.

#### **1.4. Cellules HepG2.**

Les cellules HepG2 sont des cellules issues d'hépatome humain. Elles sont utilisées depuis longtemps pour étudier la transformation de substances endogènes et exogènes par les cytochromes P450 (Schuetz *et al.*, 1993 ; Doostdar *et al.*, 1993 ; Rifkind *et al.*, 1995) mais également dans les études d'induction de cytochromes P450 par divers composés chimiques

(Cresteil *et al.*, 1987 ; Schuetz *et al.*, 1993, Kocarek *et al.*, 1995). De nombreux cytochromes P450 sont exprimés dans le foie humain. Les cellules HepG2 expriment elles aussi la plupart de ces cytochromes P450.

Dans notre étude, cette lignée servira de témoin d'expression et de régulation des cytochromes P450 pour l'étude de l'expression de ces enzymes dans les modèles de cellules vasculaires endothéliales et musculaires lisses. Les cellules HepG2 (ECACC, n°85011430), sont une lignée d'hépatomes d'origine humaine provenant d'un adolescent de type caucasien âgé de quinze ans (Aden *et al.*, 1979). Les cellules sont représentées sur la figure 21.



**Figure 21 :** Visualisation d'une culture de cellules d'hépatomes humains HepG2. Cette photographie a été réalisée au moyen d'un appareil photo Olympus couplé à un microscope Olympus (Rungis, France).

Les cellules HepG2 sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Sigma), supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (BioWest), 10 U/ml de pénicilline, 0.1 mg/ml de streptomycine, 25 µg/ml d'amphotéricine B (Sigma) dans une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'air à 37°C. Les cellules sont amplifiées tous les trois jours à raison de 1 flacon de 75 cm<sup>3</sup> dans 2 flacons de 75 cm<sup>3</sup> de la façon suivante ; les cellules sont décollées du flacon par action de 5 ml de Trypsine (Sigma) pendant 5 minutes. La solution de trypsine est alors neutralisée par ajout de 5 ml de milieu contenant du sérum de veau foetal. La suspension cellulaire ainsi obtenue est placée dans un tube de 50 ml et centrifugée pendant 5 minutes à 1000g. Le surnageant est enlevé et le culot cellulaire est repris dans quelques ml de milieu. Les cellules sont enfinensemencées dans les différents flacons de 75 cm<sup>3</sup>.

### **1.5. Conditions de conservation.**

Les cellules sont conservées dans l'azote liquide dans du milieu complet additionné de 10% de sérum de veau fœtal (BioWest) et 10 % de DMSO (Sigma, Saint Louis, MO, USA).

## **2. Tests de cytotoxicité**

### **2.1. Test du MTT.**

Ce test est basé sur la coloration des mitochondries dans les cellules vivantes. En effet, seules les mitochondries des cellules vivantes vont absorber la solution bleue de diméthylthiazolyl-diphényltétrazolium (appelée MTT). Le principe de ce test est de mesurer par absorbance la quantité de bleu absorbé par les cellules et de déterminer au moyen d'une courbe étalon la quantité de cellules vivantes dans la suspension cellulaire étudiée.

Le test est réalisé sur des plaques 96 puits. Les cellules sontensemencées dans du milieu de culture. Pour le calcul du blanc, il est nécessaire de laisser quelques puits sans cellules. Après traitement des cellules, on ajoute 20 µl de la solution MTT à 5mg/ml puis on incube environ 1 heure à l'étuve à 37°C. Le diméthylthiazolyl-diphényltétrazolium (MTT) est réduit par les déshydrogénases cellulaires en cristaux insolubles de formazan de couleur bleue qui se déposent au fond du puits. La formation des cristaux de formazan est contrôlée au microscope (Olympus®), le milieu de culture est ensuite éliminé et 200µl de DiMethyl SulfOxide (DMSO) sont ajoutés. Afin de dissoudre les cristaux de formazan, on homogénéise à la pipette. L'absorbance est lue avec un lecteur de plaques à 540 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées (Mosmann, 1983).

Solution de MTT à 5 mg/ml : préparer extemporanément et en fonction du nombre de plaques à traiter, une solution de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (Sigma) dans du tampon PBS 1X. Stériliser par filtration sur membrane d'acétate de cellulose de porosité 0,2 µm.

### **2.2. Test d'exclusion au bleu Trypan.**

Le principe de cette technique est d'évaluer le nombre de cellules mortes ayant ingéré le bleu trypan tandis que les cellules vivantes l'excluent.

- à 500  $\mu$ l de suspension cellulaire, ajouter 50  $\mu$ l de solution de Bleu Trypan à 0,4 % (Biomerieux)
- homogénéiser à la pipette et attendre 5 min.
- déposer une goutte de suspension colorée sur la lame de l'hémocytomètre
- laisser sédimenter quelques instants
- procéder à la numération cellulaire en cellule de Malassez :
  - \* les cellules colorées en bleu sont mortes (perméables au colorant)
  - \* les cellules non perméables restent claires et réfringentes : elles sont vivantes et seules à être prises en compte.

Remarque : la préparation ne doit pas contenir plus de 20 % de cellules mortes (sauf après décongélation où l'on peut en trouver davantage), pour mettre les expériences en pratique. Les cellules (notées N) présentes dans la cellule de Malassez correspondant à un volume de 1  $\mu$ l sont notées N. Le nombre de cellules est alors de N cellules /  $\mu$ l soit :  $N \times 10^3$  cellules / ml.

### **3. Traitements des cellules.**

#### **3.1. Préparation des solutions.**

Solution de lovastatine : Dissoudre 4 mg de lovastatine dans 100  $\mu$ l d'éthanol et chauffer légèrement entre 40 et 45 °C. Quand la solution est bien limpide, ajouter 890  $\mu$ l de NaOH 0,1 N. La solution obtenue a une concentration de  $10^{-2}$  M. La solution sera diluée afin d'obtenir des solutions à  $10^{-3}$  M et  $10^{-4}$  M.

Solution de fluvastatine : 4,33 mg de fluvastatine sont dissouts dans 1 ml d'eau stérile pour obtenir une solution de  $10^{-2}$  M. Les solutions à  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  M sont obtenues par dilution de la solution mère dans de l'eau stérile.

Solution d'atorvastatine : 5,77 mg d'atorvastatine sont dissouts dans 500  $\mu$ l de DMSO ; la solution obtenue a ainsi une concentration de  $2 \cdot 10^{-2}$  M. Les solutions à  $2 \cdot 10^{-3}$  et  $2 \cdot 10^{-4}$  sont obtenues par dilution de la solution mère. La toxicité apparaît à partir de 0,0625%

de DMSO (Doostdar *et al.*, 1988) ; les concentrations des solutions sont alors adaptées en fonction du volume déposé dans les boîtes de Pétri.

Solution de pravastatine : 4.46 mg de pravastatine sont dissouts dans 1 ml de méthanol afin d'obtenir une solution mère de  $10^{-2}$  M, les solutions à  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  M sont obtenues par dilutions successives de la solution mère.

### 3.2. Traitements.

Les cellules sont cultivées pendant trois jours dans des boîtes de Pétri. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu sans sérum de veau et les cellules sont soit non traitées soit traitées pendant trois jours par les différentes solutions de statines ou par les solvants respectifs de chaque molécule.

#### IV. Etudes biochimiques.

##### **1. Dosage des protéines selon la méthode de Lowry.**

En milieu alcalin, les protéines réagissent avec le réactif de Folin-Cocialteu additionné d'ions cuivriques, pour donner une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en protéines dans le milieu (Lowry *et al.*, 1951). Le protocole a été adapté en microplaques.

##### **2. Préparation des microsomes.**

Toutes les étapes se font à 4°C. Les microsomes sont préparés à partir de cultures cellulaires. Le protocole se résume de la façon suivante :

- Laver et gratter les cellules dans du PBS
- Récupérer les cellules dans un tube à centrifuger de 50 ml
- Centrifuger à 1000g pendant 5 minutes
- Resuspendre le culot dans un broyeur de cellules (Dounce) avec un tampon Tris - acide acétique
- Centrifuger à 12000g pendant 25 minutes à 4°C



- Ultracentrifuger le surnageant à 100000g pendant 50 minutes
- Reprendre le culot dans un minimum de tampon de conservation des microsomes, décrit plus loin)
- Congeler à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Tampon Tris-Acide acétique :

- Tris 0,1 M, - acide acétique
- EDTA 1mM
- KCl 0,1 M
- pH 7,4

Tampon de conservation des microsomes:

- Tris 10 mM
- EDTA 0,1 mM
- Glycerol 23 %
- pH 7,4

### **3. Western Blot.**

Les Western Blot sont réalisés selon la méthode de Laemmli (1970).

#### **3.1. Préparation des gels.**

Deux sortes de gels sont préparés : le gel de concentration qui permet de concentrer les échantillons et le gel de séparation qui permet de séparer les protéines selon leur taille.

Gel de séparation (10%) :

- |                           |             |
|---------------------------|-------------|
| - Bis-acrylamide 30 :0,8% | 5ml         |
| - 1.5M Tris pH 8,8        | 3,75 ml     |
| - 10% SDS                 | 300 $\mu$ l |
| - Glycérol 100%           | 1,5 ml      |
| - H <sub>2</sub> O        | 3,95 ml     |

- 0,25 M EDTA pH 7,0	375 µl
- TEMED	15 µl
- 10 % de persulfate d'ammonium (APS)	125 µl

Ajouter le TEMED et l'APS en dernier et sous agitation, couler 7 ml par plaque

Ajouter un filet de butanol saturé en eau sur le gel pour enlever les bulles et pour éviter la formation de « craquelure » et laisser polymériser le gel 30 minutes.

Gel de concentration (4.5%) :

- Bis-acrylamide 30 :0,8 %	1,5 ml
- 1 M Tris pH 6,8	1,25 ml
- 10 % SDS	200 µl
- H <sub>2</sub> O	6,7 ml
- 0,25M EDTA pH 7,0	250µl
- TEMED	20µl
- 10% persulfate d'ammonium (APS)	120µl

Ajouter le TEMED et l'APS en dernier et sous agitation, couler le gel et mettre tout de suite le peigne. Laisser polymériser 1 heure.

### **3.2.Préparation du marqueur et des échantillons.**

- Extraits nucléaires, 5 à 20 µg et ajouter le même volume de solution de dénaturation 2X

- Marqueur de poids moléculaire (Rainbow markers, RPN 726, Amersham Life Science) = 3µl + 20 µl de solution de dénaturation 2X par puits.

Solution de dénaturation 2X:

- Tris 1M pH 6,8	1,28 ml
- SDS 10%	5,04ml
- Glycérol 100%	2ml
- β-mercaptoéthanol	1,04 ml

- Bleu de bromophénol 0,8ml (0,25%)

Aliquoter par 1 ml et stocker à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Les échantillons et le marqueur de taille sont placés à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes puis déposés immédiatement sur le gel. La migration des échantillons se fait à 110V, le gel est placé dans du tampon de migration le TGS 1X. Lorsque les échantillons ont dépassé le gel de concentration, la migration se fait à 150V. Lorsque le front de migration atteint l'extrémité du gel, ce dernier est récupéré afin de réaliser le transfert des protéines sur la membrane.

#### Tampon tris-glycine 5X :

- Tris 24,2g
- NaCl 80g
- Ajuster le pH à 7,5 avec HCl
- Tween 20 10 ml
- H<sub>2</sub>O qsp 1 litre

### **3.3. Transfert des protéines du gel sur une membrane (ImmobilonP).**

Tremper la membrane dans du méthanol 15 secondes puis dans de l'eau pendant 15 secondes puis la laisser dans du tampon de transfert. Démouler le gel et le laisser s'équilibrer dans du tampon de transfert pendant 30 minutes.

Préparer le montage de transfert : poser 4 éponges sur le support de transfert (Biorad), préalablement imbibées de tampon, puis 4 papiers Whatmann également imbibés de tampon. Poser le gel puis la membrane en faisant attention de ne pas laisser de bulles entre le gel et la membrane. Poser ensuite de nouveau 4 papiers Whatmann et 4 éponges imbibées de tampon de transfert. Installer ce montage dans la cuve de transfert, compléter le haut de la cuve et le bac avec du tampon de transfert et laisser transférer 1h45 à 30V.

#### Tampon de transfert:

- Tris 30g
- Glycine 144g
- Ajuster à 0,9 litre

- EDTA 250mM 40ml
- SDS 10% 50ml
- H<sub>2</sub>O qsp 1 litre.

### **3.4. Saturation de la membrane.**

Tremper la membrane 5 minutes dans du rouge ponceau afin de révéler les bandes du marqueur de taille. Laver la membrane 3 fois avec du méthanol puis saturer la membrane 1 heure dans la solution de saturation.

#### Solution de saturation :

- 5g de lait en poudre.
- 100 ml de Tris glycine 5 X.

#### Tris – Glycine 5X:

- Tris 24,2g
- NaCl 80g
- Ajuster le pH à 7,5 avec HCl
- Tween 20 10ml
- H<sub>2</sub>O qsp 1 litre

### 3.5. Fixation des anticorps.

Mettre la membrane au contact du premier anticorps (dilution 1/1000 dans une solution de TBS-Tween et 250mg de lait en poudre) pendant 1 heure sous agitation à température ambiante.

Laver 4 fois 5 minutes avec la solution de lavage TBS-Tween.

Mettre la membrane au contact du deuxième anticorps (dilution 1/1000 dans une solution de TBST-Tween avec 250 mg de lait en poudre) pendant 1 heure sous agitation à température ambiante.

Laver 4 fois 5 minutes avec la solution de lavage TBS-Tween.

### 3.6. Révélation.

Egoutter la membrane et tremper la face à révéler dans une solution de luminol pendant 5 minutes. Egoutter de nouveau la membrane et placer la face à révéler contre un film transparent et placer dans la cassette de révélation. Placer un film de chimioluminescence au contact de la membrane (face à révéler) et exposer dans la cassette de révélation pendant 5 minutes. Incuber le film dans la solution de révélation jusqu'à ce que les bandes apparaissent et le tremper dans de l'eau puis dans la solution de fixation. Rincer le film sous l'eau.

## **V. Biologie moléculaire.**

### 1. Extraction des acides ribonucléiques.

a) Les veines sont sorties du congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ , découpées et placées immédiatement dans 1 ml de solution d'extraction Instapure (Eurogentec, Liege, Belgium). Toutes les manipulations se feront dans la glace. Les veines sont broyées au moyen d'un ultra-turax. Les petits morceaux de paroi élastique qui auraient pu se coincer dans l'ultra-turax sont récupérés. Le broyage est répété deux ou trois fois. Le mélange est ensuite réparti dans deux tubes Eppendorf de 2 ml. Il faut ensuite rajouter 1 ml de solution Instapure.

b) Les cellules cultivées sont récupérées directement dans l'Instapure (Eurogentec) à raison de 1 ml/boîte de Petri. Les homogénats cellulaires sont ensuite congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  ; cette étape permet d'avoir une meilleure lyse cellulaire. Les tubes sont ensuite vortexés vigoureusement.

Les tubes obtenus après les étapes a) ou b) sont ensuite vortexés. 150  $\mu\text{l}$  de chloroforme sont alors ajoutés, le mélange est vortexé de nouveau 20 secondes puis placé 10 minutes dans la glace. Les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 12000g à  $4^{\circ}\text{C}$ . Il est possible de récupérer jusqu'à 700  $\mu\text{l}$  de surnageant dans chacun des tubes. Un volume identique d'isopropanol est alors ajouté, les tubes sont vortexés vigoureusement et placés 30 minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$  afin de précipiter les ARNs. Les tubes sont de nouveau centrifugés pendant 15 minutes à 12000g à  $4^{\circ}\text{C}$ . Un culot blanc d'ARNs apparaît au fond du tube. Le surnageant est retiré en faisant attention de ne pas perdre le culot, ce dernier est ensuite lavé avec 800  $\mu\text{l}$  d'éthanol à 70 % glacé. Les tubes sont centrifugés pendant 8 minutes à 7500g à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le

surnaissant est enlevé et le culot est séché à l'air libre environ 5 minutes. Le culot est repris dans 30 µl d'eau stérile et les tubes sont incubés les tubes 10 minutes à 60°C pour permettre une bonne dissolution du culot. Les ARNs issus de la même veine sont rassemblés et dosés.

## 2. Quantification des ARNs.

La quantification et la vérification de la qualité des ARNs se fait en deux étapes :

- la mesure spectrophotométrique : cette méthode consiste à mesurer l'absorbance aux longueurs d'onde 260 nm et 280 nm. Les ARNs ne sont pas ou peu contaminés par des protéines si le rapport absorbance à 260nm / absorbance à 280 nm est compris entre 1,8 et 2. L'absorbance à 260 nm permet de connaître la quantité d'ARNs présente dans les tubes :  
[ARNs] (µg/µl) = abs 260 nm x 40 x dilution / 1000.

- une électrophorèse en gel d'agarose permet de visualiser la qualité des ARNs. En effet, l'apparition de deux bandes distinctes correspondant aux ARN ribosomiques 18S et 28S, sans aucun « smir » est la preuve de la bonne qualité des ARNs.

## 3. Technique de détection des ARNm.

La détection des ARNm des cytochromes P450 étudiés se fera au moyen d'une réaction de RT-PCR (figure 22).

### 3.1. Réaction de *reverse transcription*.

Cette réaction permet de transformer les ARNm précédemment extraits en ADNc. La quantité d'ARN total utilisée est 5 µg. Les ARN sont mélangés à 1 µl (0,5 µg) d'oligo dT (Eurogentec, Liège, Belgique) ; les oligodT se lient à la queue poly A en 3' des ARNm pour permettre l'élongation ; le volume est ajusté à 31 µl avec de l'eau stérile et le tout est incubé pendant 5 minutes à 65°C. Puis les tubes sont placés dans la glace et le tampon de reverse transcription (5µl) (Sigma), la RNasine (30U) (Sigma), la BSA (0,5µl) (Sigma) ainsi que les dNTP (0,2µM de chaque) (Sigma) sont ajoutés. L'enzyme de reverse transcription (*Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*) (450 unités) (Sigma) est ajoutée en dernier. Le

volume final est de 20 µl. Le tout est incubé deux heures à 37°C. L'activité de l'enzyme est arrêtée par 2 minutes à 90°C.

Les ADNc ainsi obtenus seront amplifiés par la réaction de PCR.

### 3.2. La *polymerase chain reaction* (PCR).

Cette méthode permet d'amplifier les ADNc des cytochromes étudiés (figure 22).

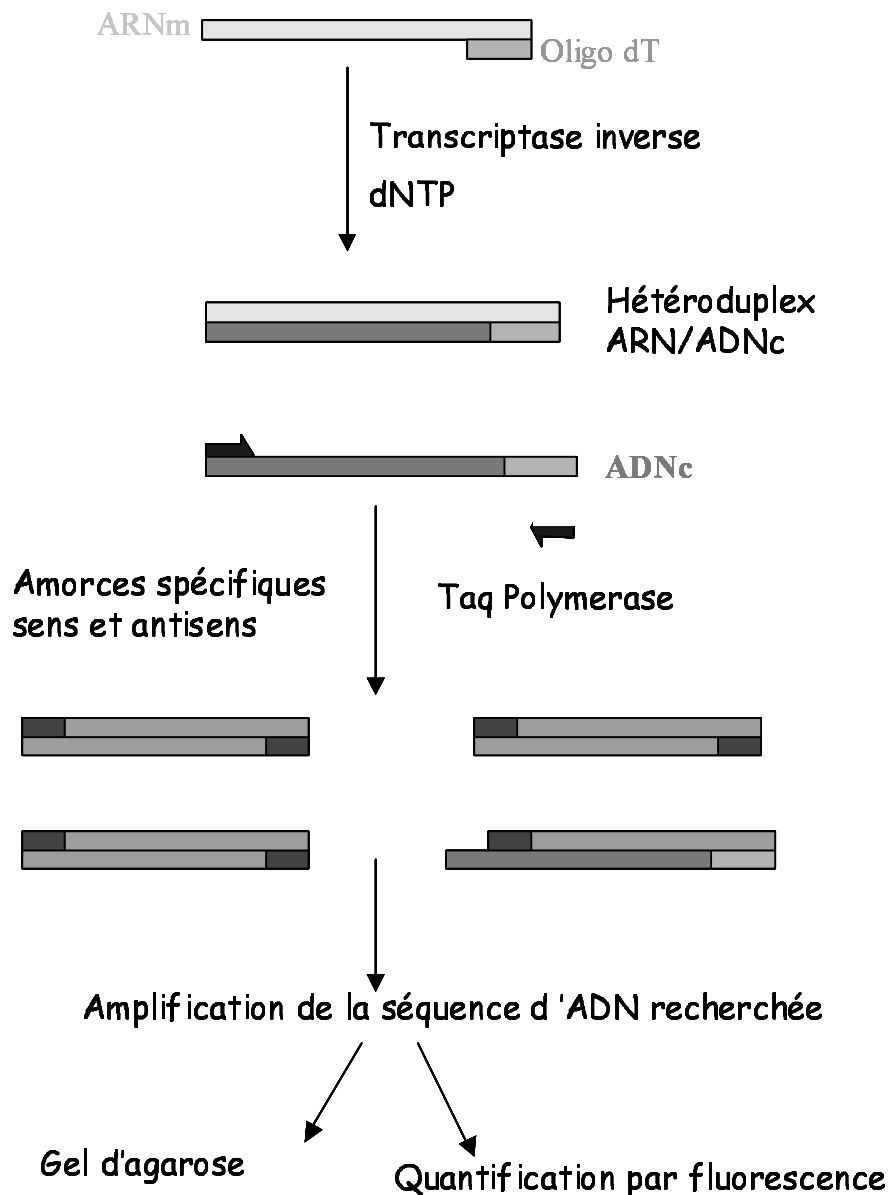


Figure 22 : Représentation schématique de la réaction de RT-PCR.

	Séquences	Température d'hybridation	Nombre de cycles	Taille	Références

GAPDH Sens	5' CCA-TCA-CCA-TCT-TCC-AGG-AG 3'	54°C	28	405 pb	Andreou <i>et al.</i> , 1998.
Anti-sens	5' GGA-TGA-TGT-TCT-GGA-GAG-CC 3'				
CYP1B1 Sens	5' GTA-TAT-TGT-TGA-AGA-GAC-AG 3'	54°C	30	316 pb	Baron <i>et al.</i> , 1998
Anti-sens	5' AAA-GAG-GTA-CAA-CAT-CAC-CT 3'				
CYP2C Sens	5' GCT-AAA-GTC-CAG-GAA-GAG-ATT-GA 3'	58°C	35	332 pb	Thum and Borlak., 2000
Anti-sens	5' TCC-TGC-TGA-GAA-AGG-CAT-GAA-GT 3'				
CYP2C8 Sens	5' AGA-TCA-GAA-TTT-TCT-CAC-CC 3'	58°C	35	158 pb	Klose <i>et al.</i> , 1999
Anti-sens	5' AAC-TTC-GTG-TAA-GAG-CAA-CA 3'				
CYP2C9 Sens	5' AGG-AAA-AGC-ACA-ACC-AAC-CA3'	58°C	40	104 pb	Klose <i>et al.</i> , 1999
Anti-sens	5' TCT-CAG-GGT-TGT-GCT-TGT-C 3'				
CYP2E1 Sens	5' AGC-ACA-ACT-CTG-AGA-TAT-GG 3'	54°C	40	366 pb	Baron <i>et al.</i> , 1998
Anti-sens	5' ATA-GTC-ACT-GTA-CTT-GAA-CT 3'				
CYP2J2 Sens	5' AGAAGCCCTTATCCACAT 3'	54°C	35	186 pb	-
Anti-sens	5' CTGAATGCGTTCCCTCTAA 3'				
CYP3A5 Sens	5' TGT-CCA-GCA-GAA-ACT-GCA-AA 3'	54°C	35	472 pb	Thum and Borlak., 2000
Anti-sens	5' TTG-AAG-AAG-TCC-TTG-CGT-GTC 3'				
CYP3A7 Sens	5' ATT-CCA-ACG-TAT-GTT-CTT-CAT-CAT 3'	54°C	34	551 pb	Schuetz <i>et al.</i> , 1994
Anti-sens	5' AAT-CTA-CTT-CCC-CAG-CAC-TGA 3'				
CYP4A11 Sens	5' TCC-TGT-CTG-CCC-ATA-TCC-TG 3'	54°C	40	332 pb	Powell <i>et al.</i> , 1998
Anti-sens	5' CGG-GCT-TAG-ATT-ATG-GTG-CG 3'				
CYP4F2 Sens	5' CGG-AAC-CCA-TCA-CAA-CCC-AGC 3'	54°C	40	122 pb	Powell <i>et al.</i> , 1998
Anti-sens	5' CTG-GGC-CCT-GCC-GAG-AAG-GGA-A 3'				
CAR Sens	5' GCA-GCT-GTG-GAA-ATC-TGT-CA 3'	60°C	35	231 pb	-
Anti-sens	5' CAG-GTC-GGT-CAG-GAG-AGA-AG 3'				
GR Sens	5' GGGGAAGAGGGAGATGGA 3'	58°C	30	105 pb	-
Anti-sens	5' GTGGTCAGAATGGGAGGC 3'				
PXR Sens	5' CAA-GCG-GAA-GAA-AAG-TGA-ACG 3'	58°C	35	441pb	Pascussi <i>et al.</i> , 2001
Anti-sens	5' CTG-GTC-CTC-GAT-GGG-CAA-GTC 3'				
COX-1 Sens	5' AGG-GCA-TCT-GTG-TCC-GCT-TC 3'	54°C	40	808 pb	-
Anti-sens	5' CAC-ACA-CGG-TTG-TGC-TCA-CG 3'				
COX-2 Sens	5' CTG-CGC-CTT-TTC-AAG-GAT-GG 3'	58°C	40	813 pb	-
Anti-sens	5' TGG-CCG-AGG-CTT-TTC-TAC-CA 3'				

**Tableau 4 :** Conditions de PCR en fonction des couples d'amorces utilisés.

### 3.2.1. La PCR semi-quantitative.



La PCR est appelée semi-quantitative car elle est basée sur le rapport entre l'intensité de bande obtenue pour le gène étudié et celle obtenue pour un gène de référence en l'occurrence la GAPDH. Les PCR pour le gène étudié et la GAPDH sont effectuées dans des conditions non saturantes déterminées précédemment.

La PCR semi-quantitative est réalisée sur iCycler® (Biorad). La réaction de PCR se fait de la façon suivante : il est nécessaire de mélanger, les dNTP (0,2 µM de chaque), le tampon de la Taq (5µl), les oligonucléotides (0,2 à 1µM), le produit de RT (2 à 4µl), la Taq polymérase (2,5 unités) et l'eau stérile (qsp 50µl).

Chaque cycle est composé de :

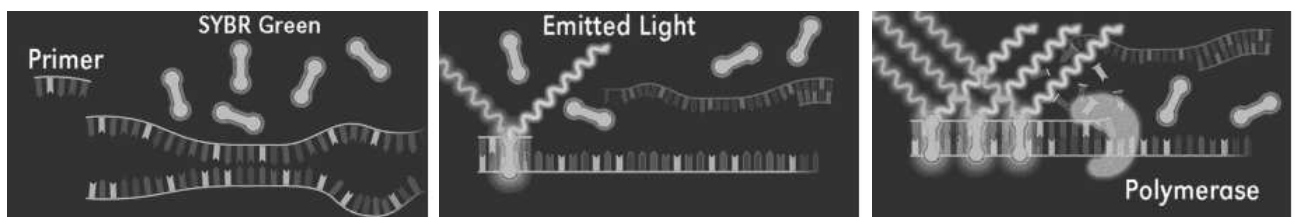
- une séparation des brins à 94°C pendant 1 minute.
- une hybridation des amorces à 54°C ou à 58°C selon les gènes étudiés pendant 1 minute.
- l'élongation se fait pendant 1 minute et 30 secondes à 72°C.

Les couples d'amorces et les conditions de PCR utilisés pour cette étude sont présentés dans le tableau 4.

### 3.2.2. La PCR quantitative.

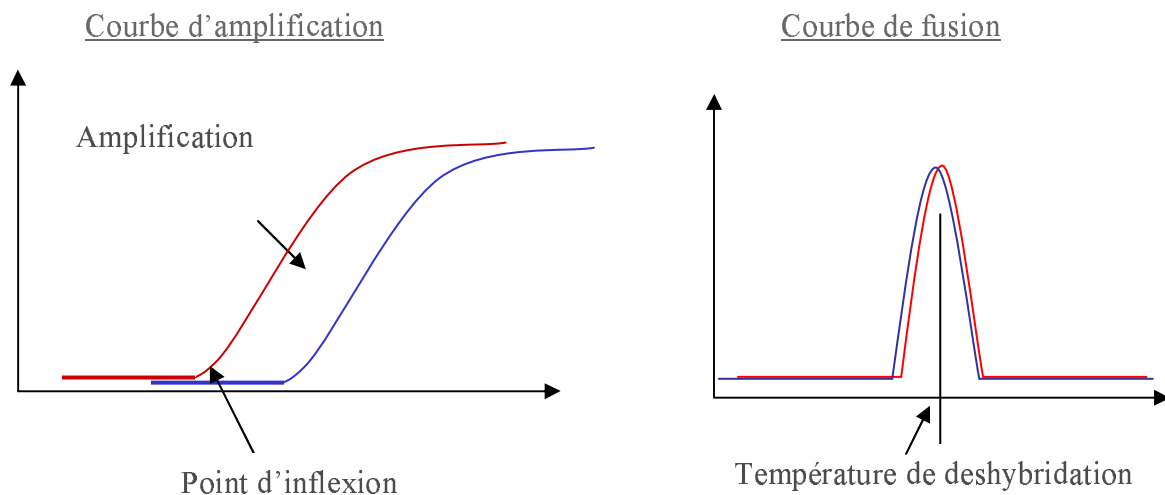
#### a. Principe.

Le principe de la PCR quantitative est de détecter en temps réel la fluorescence des brins de PCR au fur et à mesure de leur formation. la fluorescence correspond à celle du composé fluorescent : le *SYBR Green* (figure 23).



**Figure 23** : Réaction de fluorescence du *SYBR Green* après son incorporation dans les produits de PCR.

La formation des produits de PCR est représentée par des courbes de quantification . La quantité d'ADNc contenue dans les échantillons est mesurée au point d'inflexion des courbes (figure 22). La qualification des ADNc, c'est-à-dire leur identification se réalise grâce à la courbe de fusion. En effet, le pic de la courbe correspond à la température de déshybridation des produits de PCR.



**Figure 24 :** Représentation schématique des courbes d'amplification et de fusion des produits de PCR.

## b. Réaction.

La PCR quantitative est réalisée au moyen d'un thermocycler Roche. La réaction de PCR utilise un kit (Roche Diagnostics) contenant l'eau, le MGC12 et un mélange réactionnel contenant le *SYBRGreen*. Pour chaque gène testé, une gamme d'ADNc est réalisée, les dilutions utilisées sont 1/5, 1/10, 1/100 et 1/1000. Les ADNc testés sont dilués soit au 1/10 soit au 1/100 suivant le gène testé.

Chaque cycle de PCR est composé de :

- une séparation des brins à 94°C pendant 20 secondes.
- une hybridation des amorces pendant 10 à 15 secondes.
- l'élongation se fait pendant 10 à 30 secondes à 72°C. Le temps d'élongation dépend de la taille du produit de PCR que l'on doit obtenir, en effet, on considère que 25 bases sont amplifiées en 1 seconde.

## VI. ETUDES DE POLYMORPHISME.

Le génotypage est réalisé en utilisant la technique de PCR par « thermocyclage cinétique » (KTC) d'un allèle spécifique utilisée dans le laboratoire Roche Diagnostics. La technique KTC est basée sur les propriétés de l'ADN polymérase de distinguer les mésappariements entre les primers et les échantillons ADN au niveau de la position 3' du primer (Germer *et al.*, 2000). Pour chaque SNP analysé, des primers sont dessinés : un primer sens pour chaque position spécifique, en l'occurrence la position 681 et 990 du CYP2C19 et un allèle commun en position anti-sens. Selon la séquence ADN de l'échantillon, un appariement ou un mésappariement est généré. Deux réactions sont réalisées en parallèle une avec le primer commun et le primer correspondant à la base mutée en position 681 et l'autre avec le primer commun et celui correspondant au primer de la base mutée en position 990. Pour chaque réaction, la formation d'un produit de PCR double brin est fonction de la présence d'un appariement ou d'un mésappariement en position 3' entre le primer et l'ADN. Ceci reflète donc l'association ou non de l'allèle spécifique correspondant à la position du SNP. La formation des doubles brins d'ADN pendant la PCR est détectée par un intercalant fluorescent de l'ADN, le colorant SYBR Green. Les réactions de PCR sont réalisées sur un appareil ABI Prism 7900 (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland) où les intensités de la fluorescence sont enregistrées pendant l'amplification. La fluorescence est fonction du nombre de cycles.

Le nombre de cycles, pour lequel la courbe croise un seuil prédéfini, est appelé le Ct de la réaction. Après la réaction de PCR, les produits subissent un processus de dénaturation rapide puis renaturation et enfin dénaturation rapide. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées afin de calculer les courbes de dissociation des produits de PCR qui caractérisent ces derniers. Les produits générés avec la même combinaison de primers sont considérés comme identiques et produisent ainsi des courbes de dissociation identiques.

L'analyse des allèles est réalisée de la manière suivante : dans une première étape, chaque réaction d'amplification est analysée de façon indépendante ; un score positif est attribué si le Ct est inférieur au Ct<sub>max</sub> défini préalablement avec de l'ADN contrôle de génotypes connus et un score négatif est attribué si le Ct est supérieur au Ct<sub>max</sub>. A cette étape, toutes les courbes donnant un Ct négatif correspondent à des réactions qui n'ont pas fonctionné. Dans une deuxième étape, pour chaque échantillon d'ADN, une valeur de  $\Delta Ct$  est

déterminée en soustrayant le Ct pour l'allèle 2 du Ct pour l'allèle 1. Tous les échantillons positifs dans la première étape pour 1 allèle sont considérés comme homozygotes pour cet allèle si leur  $\Delta Ct$  est supérieur à un seuil de  $\Delta Ct_{min}$  déterminé pendant un précédente phase d'optimisation. Tous les échantillons qui ont donné une valeur de Ct positive pour les deux allèles sont considérés comme hétérozygotes si leur  $\Delta Ct$  est inférieur à la valeur absolue de  $\Delta Ct_{max}$ . Tous les échantillons pour lesquels le  $\Delta Ct$  n'a pas pu être déterminé est considéré comme inexploitable.

Les primers utilisés pour l'étude du SNP 681 sont :

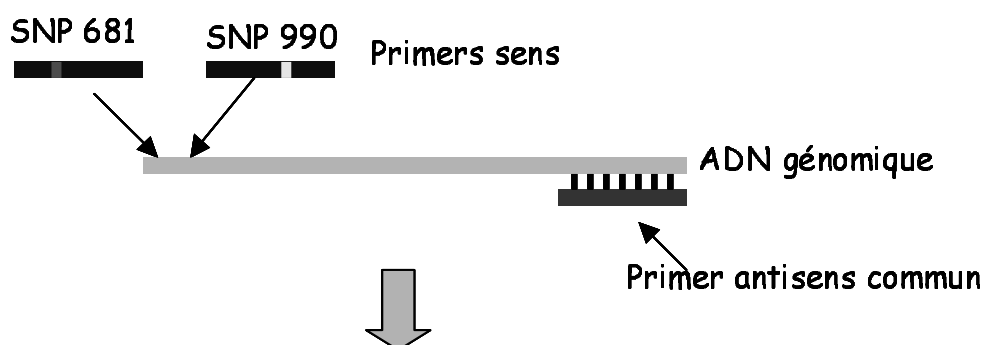
- K243 5' AAGTAATTTGTTATGGGTCCC 3' primer spécifique
- K244 5' AAGTAATTTGTTATGGGTCCT 3' primer spécifique
- K245 5' ATGCAATAATTTCCCACTATCATT 3' primer commun

Les primers utilisés pour l'étude du SNP 990 sont :

- K257 5' AGGAAGAGATTGAACGTGTC3' primer spécifique
- K258 3' CAGGAAGAGATTGAACGTGTT 5' primer spécifique
- K259 5' CAGGGGCTCCGGTTTCTG 3' primer commun

Les réactions sont réalisées comme décrit par Germer *et al.*, (2000), avec les modifications suivantes : le volume final de réaction est de 20  $\mu$ l, la concentration finale des primers sont de 0,4  $\mu$ M pour K243, K244 et K245 et de 0,15  $\mu$ M pour les primers K257, K258 et K259 et la température d'hybridation est de 56°C pour les primers K243, K244 et K245 et de 59°C pour les primers K257, K258 et K259.

Un schéma récapitulatif de cette technique est présentée sur la figure 25.



*Figure 25 : Représentation de la technique de « thermocyclage cinétique ».*

## **VII. ETUDES STATISTIQUES.**

Les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel SAS version 8.2 (SAS Institute Inc. Etats-Unis). L'équilibre de Hardy-Weinberg a été étudié par l'intermédiaire du

test du  $\chi^2$ . les analyses comparatives ont été réalisées séparément chez les hommes et les femmes.

Une transformation logarithmique a été réalisée afin d'obtenir une distribution normale des variables étudiées (IL-6, TNF- $\alpha$ , Protéine-C-réactive, leucocytes, triglycérides et HDL, pression sanguine). Dans une première étape, le degré de significativité des polymorphismes vis-à-vis des différentes variables étudiées a été déterminé par un test ANOVA. Compte tenu du faible nombre d'individus homozygotes pour l'allèle rare (681A ou 990T), les individus homozygotes pour l'allèle sauvage (AA en position 681 ou CC en position 990) seront comparés à l'ensemble des individus hétérozygotes (AG en position 681 ou CT pour la position 990) et des individus homozygotes pour l'allèle rare (GG pour la position 681 ou TT pour la position 990). Les relations linéaires entre les variables continues ont été évaluées par l'analyse de corrélation de Pearson. Dans une dernière étape, afin de déterminer les effets quantitatifs de différents covariants (la consommation d'alcool et de tabac, l'âge, l'indice de masse corporelle et les médicaments contraceptifs) en fonction de la présence de l'allèle muté ou pas, une analyse de régression multiple a été réalisée séparément pour chaque variable. Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ .

## **I. Enzymes impliquées dans la production de molécules vasoactives.**

Le tonus vasculaire représente l'équilibre existant entre molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices. Ces composés vaso-actifs sont produits par des cytochromes P450, des

cyclooxygénases ou encore des NO synthases. Une dérégulation de l'expression de ces enzymes peut conduire à une modification du tonus vasculaire. Il a été démontré qu'une modification de l'homéostasie vasculaire contribue au développement de certaines maladies cardiovasculaires telles que la pathologie variqueuse. Ainsi une dérégulation de l'expression des enzymes productrices de molécules vaso-actives peut conduire à une modification du tonus vasculaire (Schuller-Petrovic *et al.*, 1997).

Les molécules vasodilatatrices sont les acides epoxyeicosatriénoïques (EETs) produits par certains cytochromes P450 (CYP2C, CYP2E1, CYP2J2) et la prostaglandine I2 produite par la voie des cyclooxygénases. Les molécules vasoconstrictrices, telles que les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) sont produites par les cytochromes P450 (CYP1B1, CYP4A11, CYP4F2, CYP2E1), la prostaglandine H2 et le thromboxane A2 sont produits par la voie des cyclooxygénases. Le NO, molécule vasodilatatrice, provient de la transformation de la L-arginine par la NO synthase endothéliale ou inducible. Les molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices jouent un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire. Une modification de l'équilibre entre ces deux types de molécules serait un facteur déclenchant ou aggravant de certaines pathologies notamment la pathologie variqueuse.

Compte tenu du rôle important de ces enzymes dans le tonus vasculaire, nous avons émis l'hypothèse que l'expression de ces enzymes était modifiée dans la pathologie variqueuse. Notre étude a consisté à étudier la différence d'expression des cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de l'acide arachidonique, de deux cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) et de deux NO synthases : endothéliale (eNOS) et inducible (iNOS) dans des veines saphènes humaines saines et variqueuses. Pour cela, nous avons recherché l'expression des ARNm de ces enzymes au moyen de la technique de RT-PCR. De plus, la pathologie variqueuse étant caractérisée par une modification de la composition des parois vasculaires (Badier-Commander *et al.*, 2001), notamment au niveau cellulaire, nous avons profité de résultats décrivant le volume des cellules musculaires lisses et nous avons corrélé ce volume cellulaire au taux d'expression des cytochromes P450. Dans un deuxième temps, afin de localiser plus précisément ces enzymes vaso-actives, nous avons étudié leur expression dans une culture primaire de cellules endothéliales : les cellules de veines saphènes humaines HSaVEC et dans une culture de cellules musculaires lisses.



## 1. Expression des enzymes vaso-actives dans les tissus veineux humains (Publication n°1).

Les expressions des cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de l'acide arachidonique ont été étudiées dans les tissus de veines saphènes humaines provenant de patients ayant subi un pontage coronarien pour les échantillons de veines saines et de patients ayant subi un stripping pour les échantillons de veines variqueuses. Les caractéristiques des patients sont résumées dans les tableaux 5 et 6.

	<b>Patients</b>				
	<b>Echantillon N°</b>	<b>Age</b>	<b>Sexe</b>	<b>Pathologie associée</b>	<b>Traitement</b>
<b>Veines saines</b>	1	54	M	-	-
	2	67	F	Hypertension	dihydroergotamine
	3	69	F	<b>I.1.1. Hypercholestérolémie</b>	Dopamine, atropine

	4	48	M	Hypertension, hypercholestérolémie	acebutolol, atorvastatine
	5	56	M	-	-
	6	44	M	-	-
	7	71	F	-	-
	8	59	M	-	-
	9	76	M	-	-
	10	64	F	<b>I.1.2. Hypercholestérolémie</b>	nicardipine, atorvastatine, naftidrofuryl, aspirine
	11	48	M	<b>I.1.3. Hypertension Hypercholestérolémie</b>	Atorvastatine Acebutolol
	12	69	F	<b>I.1.4. Hypercholestérolémie</b>	Dopamine, atropine, ranitidine, aspirine, propacétamol, héparine, midazolam
	13	68	M	<b>I.1.5. hypercholestérolémie, hypertension</b>	Aténolol, ramipril, aspirine, pravastatine
	14	62	M	<b>I.1.6. hypertension, hypercholestérolémie</b>	acébutolol, atorvastatine
	15	71	F	<b>I.1.7.</b>	

*Tableau 5 : Caractéristiques des patients non atteints de pathologie variqueuse .*

<b>Patients</b>					
	<b>Echantillon N°</b>	<b>Age</b>	<b>Sexe</b>	<b>Pathologie associée</b>	<b>Traitement</b>

A	32	M	-	-
B	49	M	-	-
C	52	M	-	-
D	46	F	-	flavonoïde
E	45	M	Hypercholestérolémie	-
F	32	M	-	-
G	42	F	-	-
H	62	F	-	-
I	35	F	-	flavonoïde
J	77	F	Hypertension	captopril acebutolol
K	42	F	Incontinence tronculaire	flavonoïde
L	54	M	Incontinence tronculaire	captopril
M	45	M	Incontinence tronculaire, Hypercholestérolémie	
N	77	F	Incontinence tronculaire	captopril, acebutolol
O	77	F	Incontinence tronculaire	-
P	48	F	Incontinence tronculaire	-
Q	36	F	Incontinence tronculaire	-
R	77	F	Incontinence tronculaire	captopril, acebutolol
S				
T	45	M	Incontinence tronculaire	-

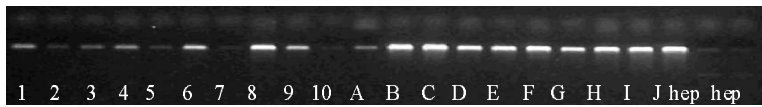
Tableau 6 : Caractéristiques des patients atteints de pathologie variqueuse .

### 1.1. Expression des cytochromes P450.

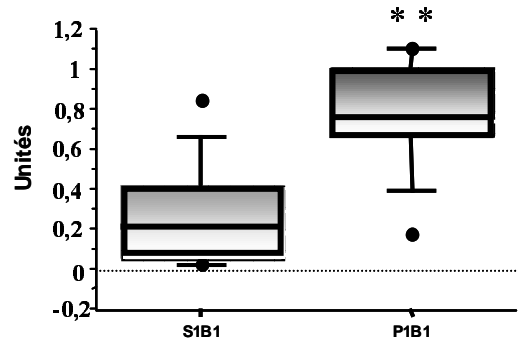
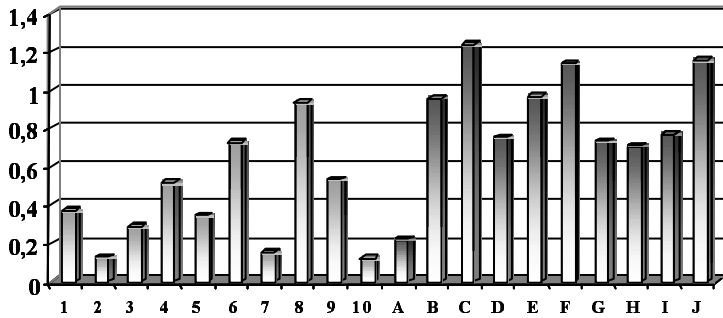
L'expression de 6 cytochromes P450 a été étudiée par la technique de RT-PCR dans deux séries de veines saphènes. La première série comprenant 10 veines saines et 10 veines variqueuses, la deuxième série comprenant 5 veines saines et 10 veines variqueuses. Les résultats sont exprimés par rapport à l'expression d'un gène domestique : la GAPDH.

#### 1.1.1. Le cytochrome P450 1B1.

Le cytochrome P450 1B1 n'est pas le plus important des cytochromes P450 vasculaires, il est responsable de la formation du 12-HETE dans l'oeil humain (Schwartzman *et al.*, 1987). Cependant il est localisé dans les cellules musculaires lisses et peut donc être également impliqué dans la régulation du tonus vasculaire. C'est pourquoi nous avons étudié l'expression de son ARNm dans les veines saphènes humaines variqueuses, les résultats sont présentés sur la figure 26.



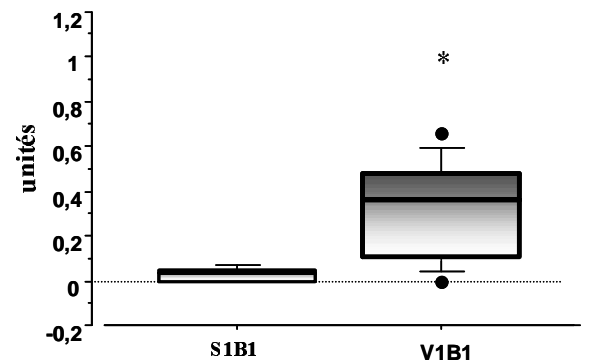
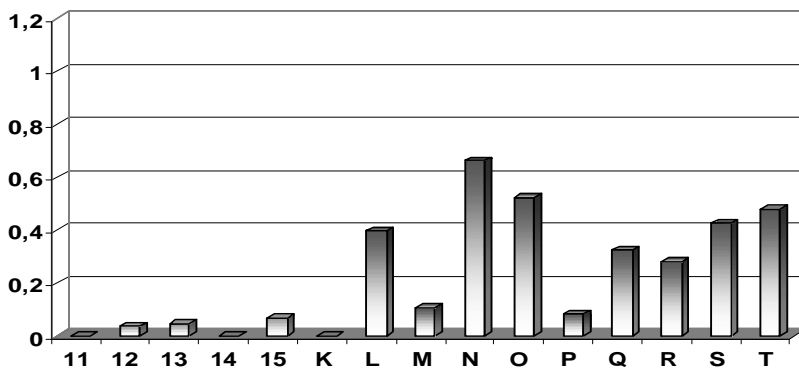
CYP1B1/GAPDH



**Figure 26a:** Expression du cytochrome P450 1B1 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 1...10 : veines saines ; A...J : veines variqueuses, Hep : lignée HepG2. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Les cercles noirs représentent l'intervalle de confiance.



CYP1B1/GAPDH



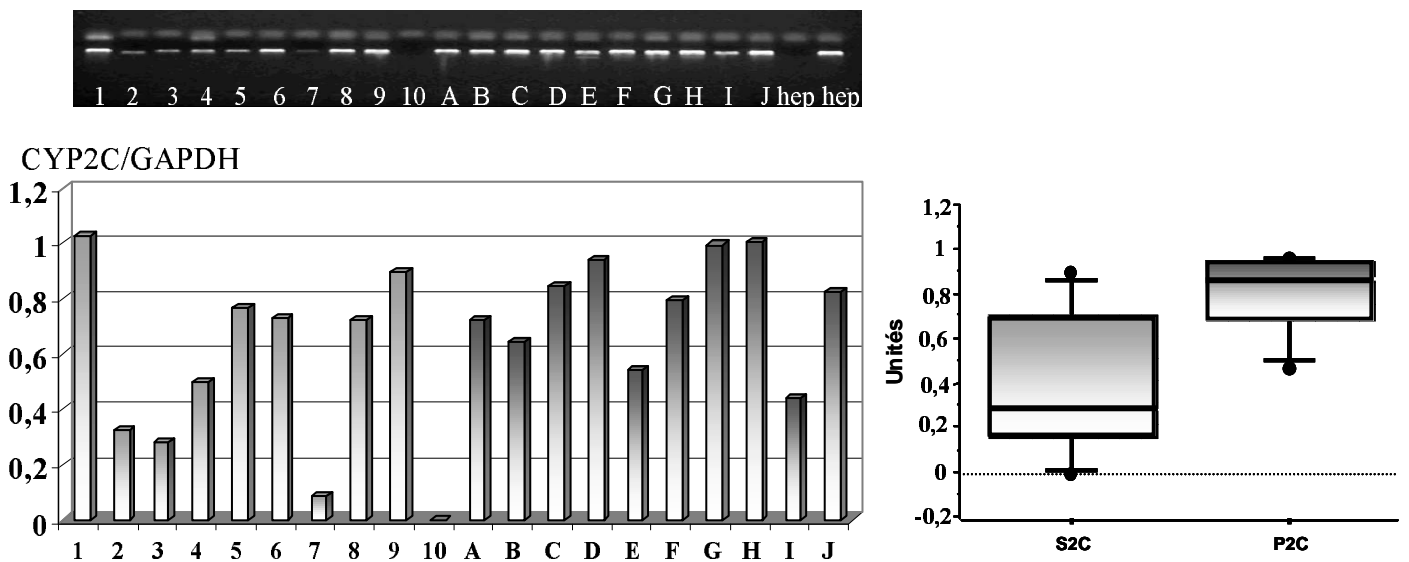
**Figure 26b:** Expression du cytochrome P450 1B1 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 11...15 : veines saines ; K...T : veines variqueuses. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Les cercles noirs représentent l'intervalle de confiance.

De façon générale, nous pouvons observer que l'expression du cytochrome P450 1B1 est plus élevée dans les échantillons de veines variqueuses comparées aux échantillons des veines pathologiques. Les échantillons A, M et P des veines pathologiques présentent une faible expression de l'ARNm de CYP1B1. D'après le test de Wilcoxon, l'expression du

CYP1B1 dans les veines pathologiques est 1.5 fois plus élevée que dans les veines saines (figure 24).

### 1.1.2. Le cytochrome P450 2C total.

La famille des cytochromes P450 2C comporte 4 membres : les CYP2C8, 2C9, 2C18 et 2C19 (Goldstein *et al.*, 1994). C'est la principale famille de cytochromes P450 impliquée dans la production de métabolites vaso-actifs notamment les EETs (Daikh *et al.*, 1994 ; Zeldin *et al.*, 1996) et c'est actuellement la plus étudiée. Dans les résultats présentés ci-dessous, nous ne distinguerons pas les 4 isoformes de cette famille puisque les amorces utilisées pour cette partie du travail nous permettent de détecter uniquement les cytochromes P450 2C totaux. Les résultats sont présentés sur la figure 27.



**Figure 27a:** Expression du cytochrome P450 2C dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 1...10 : veines saines ; A...J : veines variqueuses, Hep : lignée HepG2. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Les cercles noirs représentent l'intervalle de confiance.



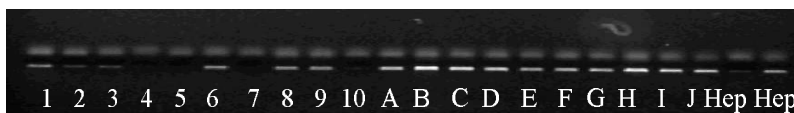
Unités

**Figure 27b:** Expression du cytochrome P450 2C dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 11....15 : veines saines ; K....T : veines variqueuses. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Les cercles noirs représentent l'intervalle de confiance.

L'expression des cytochromes P450 de la famille 2C tend à être plus élevée dans les échantillons variqueux que dans les échantillons de veines saines. Toutefois, selon le test de Wilcoxon, la différence observée n'est pas significative (figure 25).

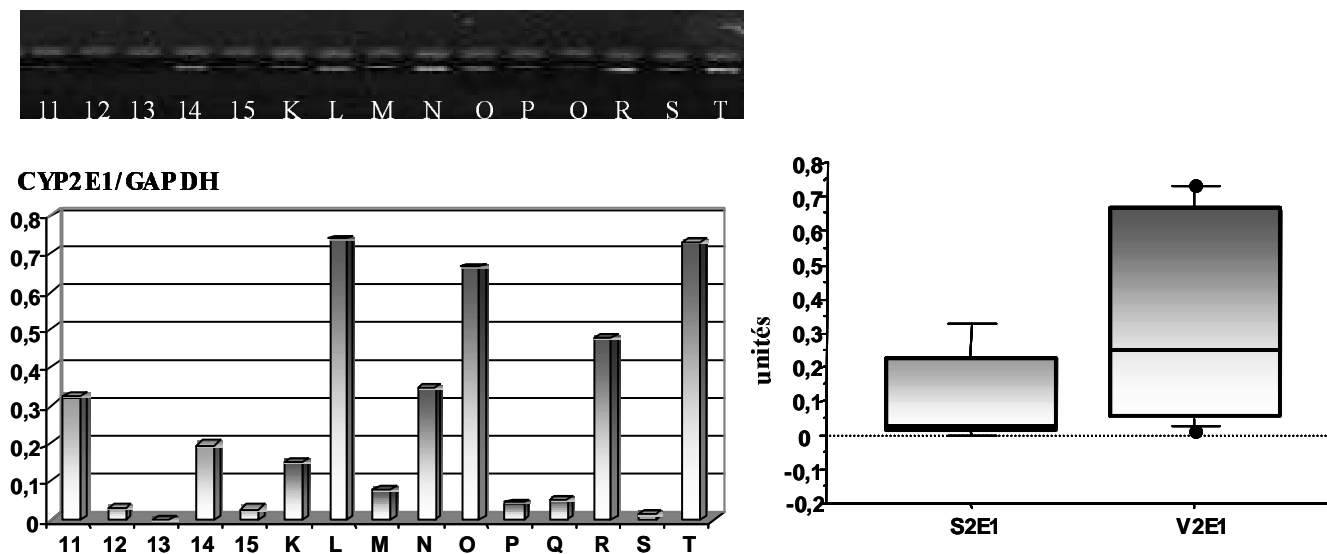
### 1.1.3. Le cytochrome P450 2E1.

Le cytochrome P450 2E1 est responsable principalement de la formation du 19-HETE (Amet *et al.*, 1995). La localisation principale de ce cytochrome P450 est le foie (Botto *et al.*, 1994) mais des études décrivent sa présence dans les cellules endothéliales humaines (Farin *et al.*, 1994 ; Hoebel *et al.*, 1998 ).



## CYP2E1/GAPDH

**Figure 28a:** Expression du cytochrome P450 2E1 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 1...10 : veines saines ; A...J : veines variqueuses, Hep : lignée HepG2. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Les cercles noirs représentent l'intervalle de confiance.



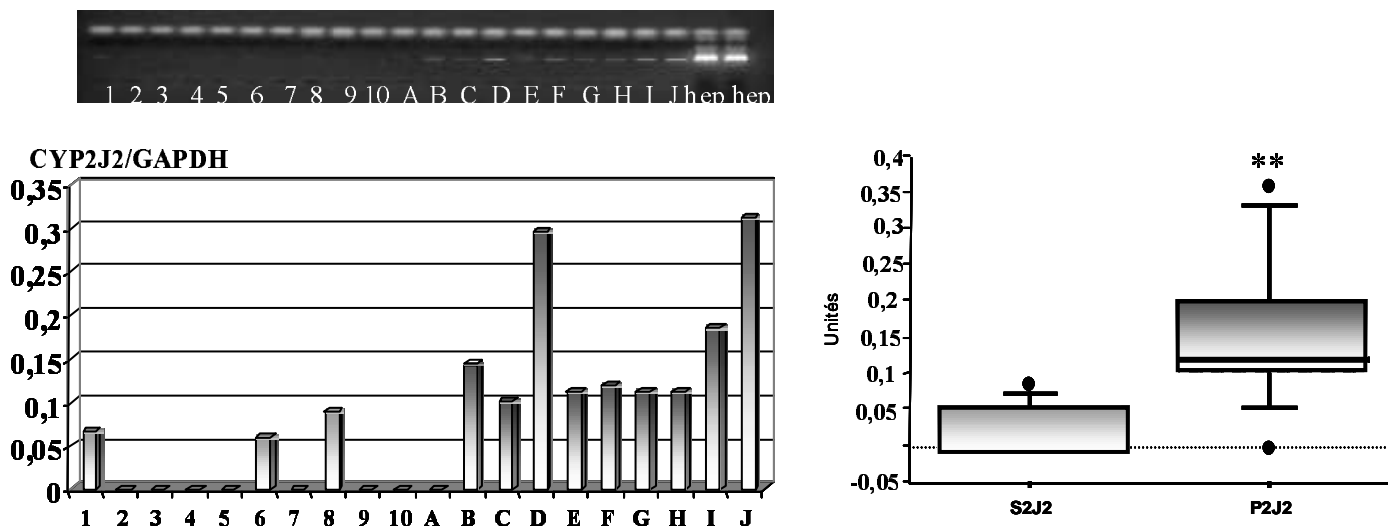
**Figure 28b:** Expression du cytochrome P450 2E1 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 11...15 : veines saines ; K...T : veines variqueuses. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Les cercles noirs représentent l'intervalle de confiance.

Ces résultats présentés sur la figure 28 montrent que l'expression du cytochrome P450 2E1 est plus élevée dans les veines pathologiques que dans les veines saines. En effet, nous pouvons constater que le CYP2E1 est détecté dans tous les échantillons de veines

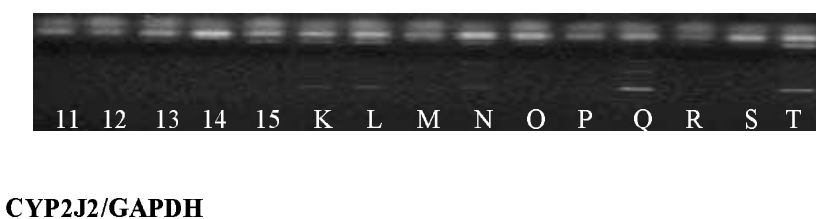
pathologiques avec un rapport d'expression d'environ 0,3 alors que le CYP2E1 n'est détecté que dans 10 échantillons de veines saines sur 15 avec un rapport d'expression de 0,05. Le test de Wilcoxon nous montre que la différence d'expression est significative et d'environ 3,36 fois, figure 28.

#### 1.1.4. Le cytochrome P450 2J2.

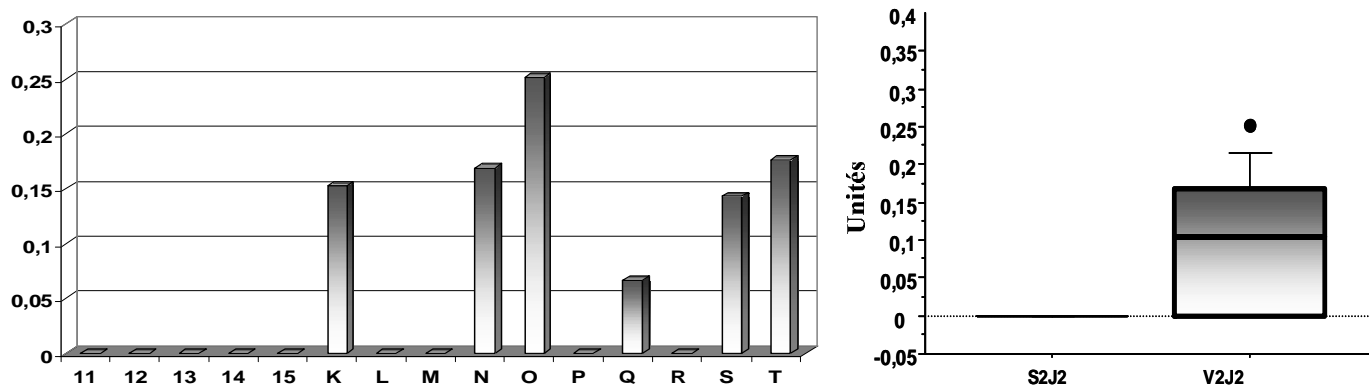
Le cytochrome P450 2J2 est responsable du métabolisme de l'acide arachidonique en acides époxyeicosatriénoïques (EETs) (Scarborough *et al.*, 1999). Ce cytochrome P450 est un peu moins étudié que les cytochromes P450 de la famille 2C mais son rôle dans la régulation du tonus vasculaire semble être tout aussi important. C'est pour cela que nous avons étudié l'expression de cette enzyme dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats sont présentés sur la figure 29.



**Figure 29a:** Expression du cytochrome P450 2J2 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont donnés par normalisation avec le GAPDH : 1...10 : veines saines ; A...J : veines variqueuses, Hep : lignée HepG2. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Les cercles noirs représentent l'intervalle de confiance.





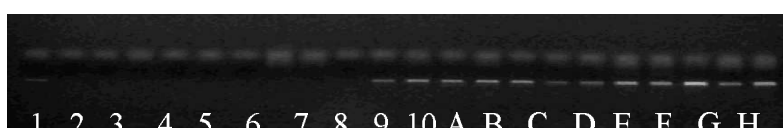


**Figure 29b:** Expression du cytochrome P450 2J2 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 11...15 : veines saines ; K...T : veines variqueuses. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Les cercles noirs représentent l'intervalle de confiance.

Le CYP2J2 semble être le cytochrome P450 le plus affecté par la pathologie variqueuse. En effet, ces résultats nous montrent que les échantillons de veines variqueuses expriment tous le CYP2J2 à l'exception d'un seul échantillon alors que seuls trois échantillons de veines saines expriment le cytochrome P450 2J2. Le test de statistique de Wilcoxon nous montre que l'expression de l'ARNm de CYP2J2 est significativement plus importante dans les veines pathologiques comparées aux veines saines, la différence observée est d'environ 7 fois.

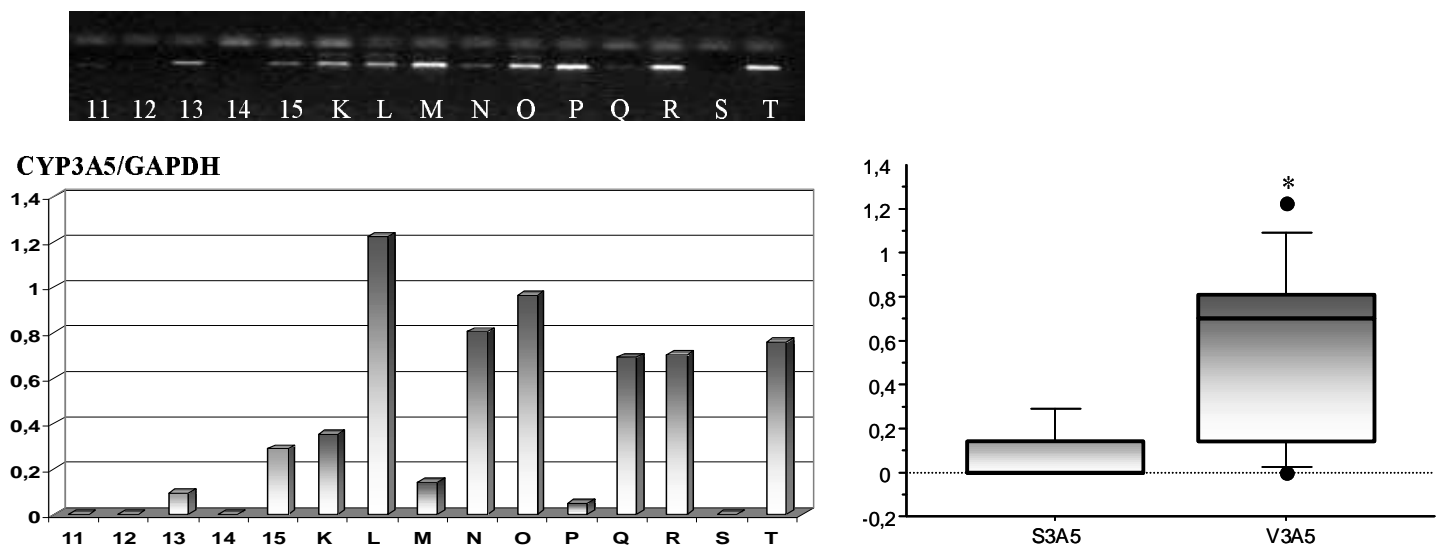
### 1.1.5. Le cytochrome P450 3A5.

Les cytochromes P450 de la famille 3A sont exprimés en proportion élevée dans le foie. Toutefois, ces cytochromes P450 sont également présents dans des tissus vasculaires tels que les cellules endothéliales (Farin *et al.*, 1994 ; Hoebel *et al.*, 1998) et sont impliqués dans la production de métabolites vaso-actifs tels que le NO à partir d'isosorbide dinitrate (Minamiyama *et al.*, 1999). Une étude plus récente décrit leur rôle dans la production d'acides epoxyeicosatriénoïques à partir de l'acide arachidonique (Ayajiki *et al.*, 2003). Nous avons choisi d'étudier plus particulièrement le CYP3A5 qui semble être l'isoforme la plus importante dans les tissus vasculaires. L'expression de cette enzyme dans les veines saines et variqueuses est présentée sur la figure 30.



## CYP3A5/GA

**Figure 30a** : Expression du cytochrome P450 3A5 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 1...10 : veines saines ; A...J : veines variqueuses, Hep : lignée HepG2. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Les cercles noirs représentent l'intervalle de confiance.



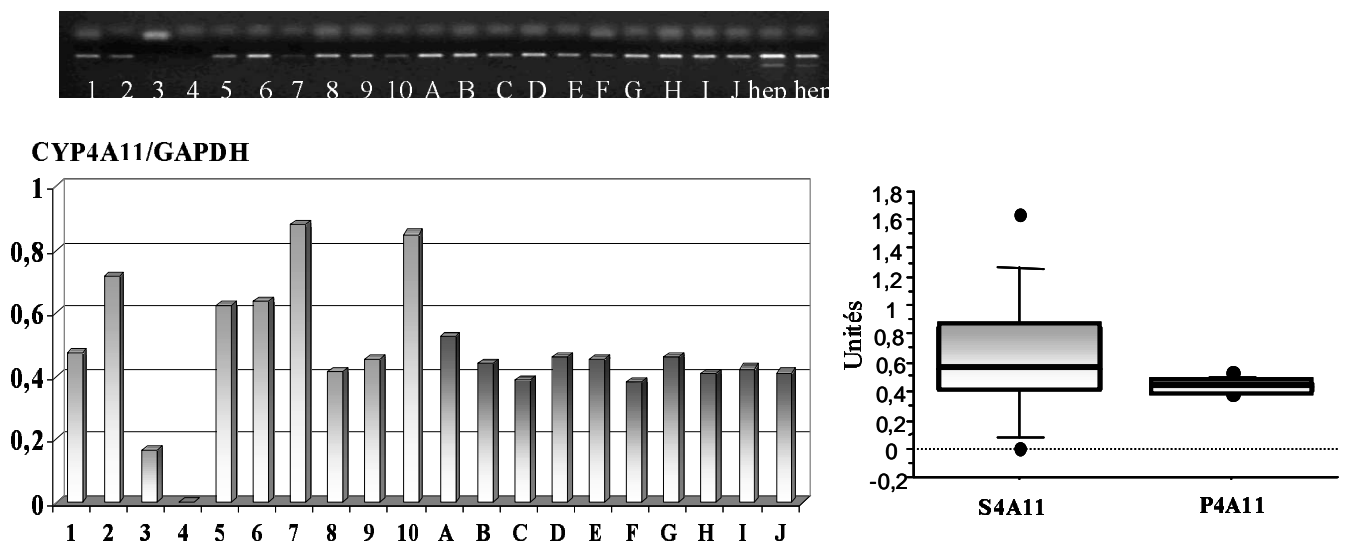
**Figure 30b** : Expression du cytochrome P450 3A5 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 11...15 : veines saines ; K...T : veines variqueuses. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Les cercles noirs représentent l'intervalle de confiance.

Les résultats de la figure 30 nous montrent que le CYP3A5 est exprimé principalement dans les échantillons de veines variqueuses. En effet, seulement trois échantillons de veines

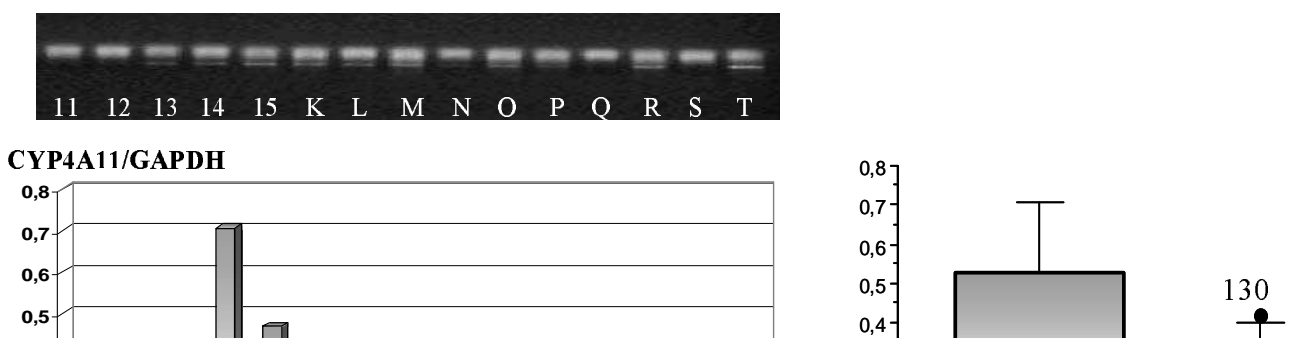
saines sur 15, expriment le CYP3A5. En raison de cette quasi absence, le test statistique de Wilcoxon nous montre une différence très significative entre les veines saines et variqueuses (figure 28).

### 1.1.6. Le cytochrome P450 4A11.

Le cytochrome P450 4A11 est responsable principalement de la formation de l'acide hydroxyeicosatetraénoïque : le 20-HETE (Powel *et al.*, 1998). Cette enzyme est localisée principalement dans le foie et le rein (Bell *et al.*, 1993) mais a également été localisée dans les microvaisseaux (Imig *et al.*, 1996). Le métabolite 20-HETE jouant un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire (Lasker *et al.*, 2000), nous avons étudié l'expression de l'ARNm dans les échantillons de veines saphènes humaines saines et pathologiques. Les résultats sont présentés sur la figure 31.



**Figure 31a:** Expression du cytochrome P450 4A11 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 1...10 : veines saines ; A...J : veines variqueuses, Hep : lignée HepG2. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Les cercles noirs représentent l'intervalle de confiance.



**Figure 31b:** Expression du cytochrome P450 4A11 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 11....15 : veines saines ; K... T : veines variqueuses. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Le cytochrome P450 4A11 est exprimé dans la plupart des échantillons veineux. Toutefois même s'il semble que l'expression du CYP4A11 est plus faible dans les échantillons de veines pathologiques, cependant, la différence n'est pas significative.

### 1.1.7. Les cytochromes P450 dans les veines saphènes humaines.

Afin de mieux visualiser les différences observées entre les veines saines et variqueuses et de mieux comparer les différents cytochromes P450 entre eux, nous avons réalisé un schéma récapitulatif des valeurs obtenues pour les 15 échantillons de veines saphènes saines et les 20 échantillons de veines saphènes pathologiques. Ces résultats sont présentés sur la figure 32.



\*\*

\*\*

\*\*

*Figure 32 : Expression des cytochromes P450 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses (\*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$ ).*

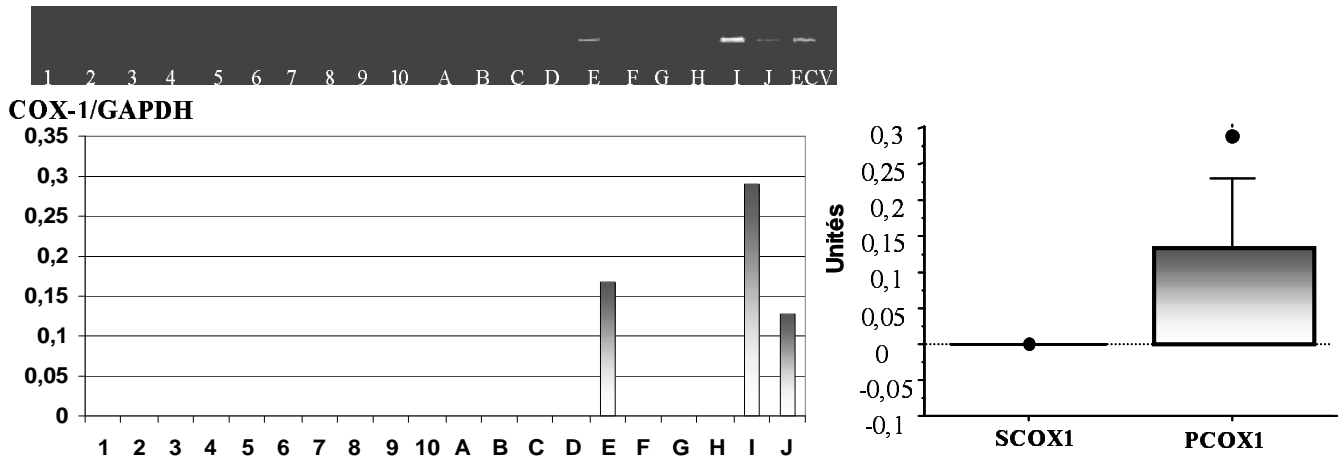
La plupart des cytochromes sont plus exprimés dans les veines variqueuses. Les différences d'expression entre les veines saines et variqueuses obtenues sont de 2,4 pour CYP1B1, 1,3 pour CYP2C, 1,4 pour CYP2E1, 4,3 pour CYP2J2, 2 pour CYP3A5 et 0,94 pour CYP4A11. Le CYP4F2 n'a pas été détecté dans les échantillons que nous avons testés. Les études statistiques ont été réalisées au moyen du test de Wilcoxon, seuls les cytochromes P450 1B1, 2E1,2J2 et 3A5 présentent une différence significative.

## **1.2. Expression des cyclooxygénases.**

Les cyclooxygénases de type 1 et 2 présentes dans les cellules endothéliales et musculaires lisses ont des expressions modifiées dans différentes conditions biologiques et notamment en cas de réaction inflammatoire. Nous avons donc examiné si leur expression était modifiée dans la pathologie variqueuse. Sur la figure 3 sont représentés les expressions des cyclooxygénases de type 1 et 2 dans 10 échantillons de veines saines et 10 échantillons de veines pathologiques. Comme pour les cytochromes P450, les résultats sont exprimés par rapport à la GAPDH.

### **1.2.1. Cyclooxygénase de type 1.**

La cyclooxygénase de type 1 (COX-1) est responsable de la production de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Cette enzyme est exprimée dans les cellules musculaires lisses. Compte tenu de son rôle dans la production de molécules vaso-active et de sa localisation cellulaire, nous avons étudié son expression dans la pathologie variqueuse. Les résultats sont présentés sur la figure 33.



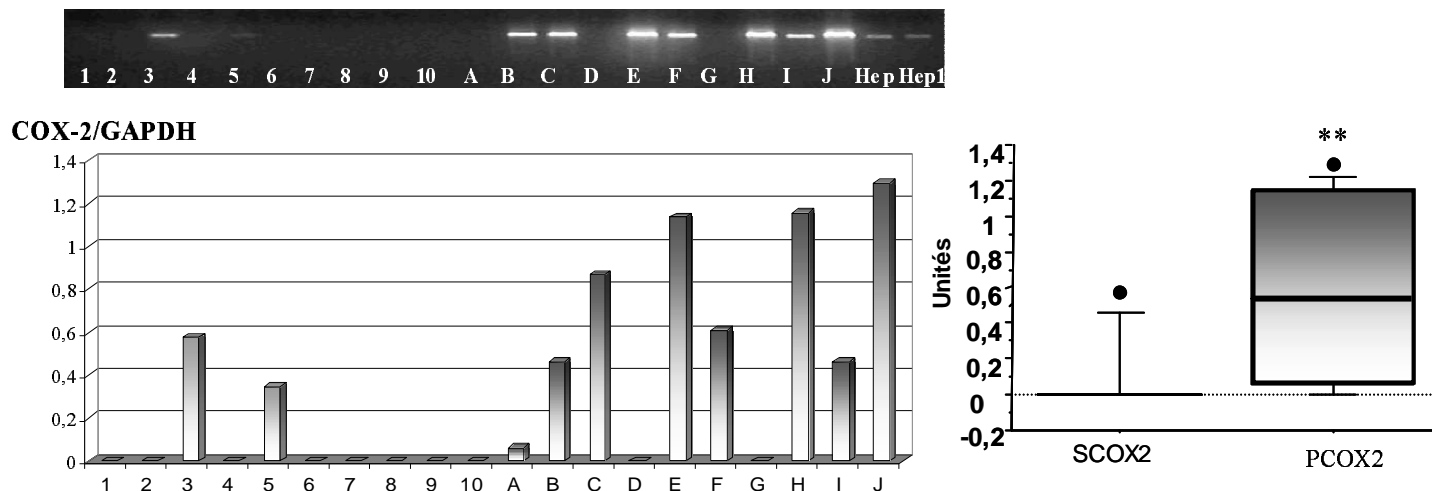
**Figure 33:** Expression de la cyclooxygénase-1 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont donnés par normalisation avec le GAPDH : 1...10 : veines saines ; A...J : veines variqueuses, Hep : lignée HepG2. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

La cyclooxygénase de type 1 est peu exprimée dans les veines saphènes humaines, en effet, seuls 3 échantillons de veines variqueuses présentent une expression de COX-1. Il semble que l'expression soit plus importante dans les veines pathologiques comparées aux veines saines mais la présence de COX-1 dans seulement trois échantillons ne suffit pas à conclure sur une éventuelle différence d'expression.

### 1.2.2. Cyclooxygénase de type 2.

La cyclooxygénase de type 2 est également impliquée dans la transformation de l'acide arachidonique en composés vaso-actifs, les prostaglandines. Cette isoforme est

présente principalement dans les cellules endothéliales. Les prostaglandines jouant un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire, nous avons étudié l'expression de la cyclooxygénase de type 2 dans les échantillons de veines saphènes. Les résultats sont présentés sur la figure 34.



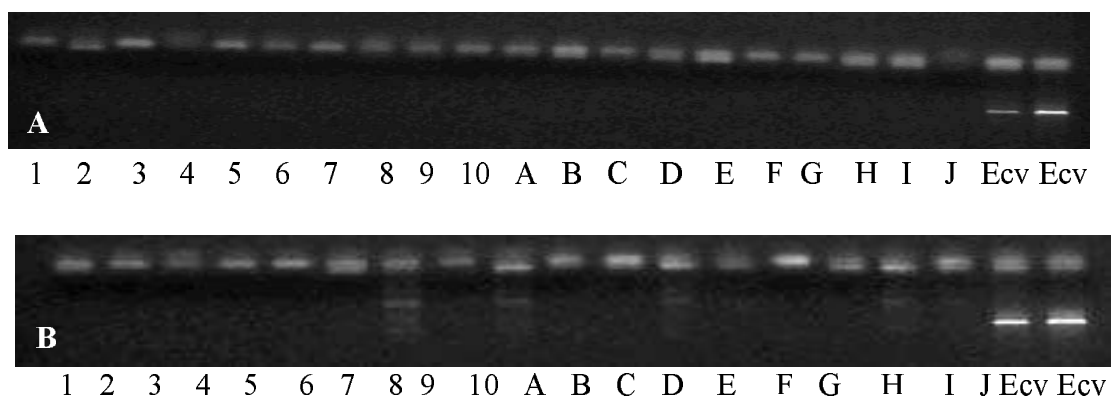
**Figure 34:** Expression de la cyclooxygénase-2 dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses. Les résultats des produits de PCR visualisés par électrophorèse sont donnés pour chaque individu, sur le graphe, les résultats des quantifications individuelles sont données par normalisation avec le GAPDH : 1...10 : veines saines ; A...J : veines variqueuses, Hep : lignée HepG2. Le graphe de droite présente les données statistiques obtenues par le test de Wilcoxon (S : saines, P : pathologiques), \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

La cyclooxygénase de type 2 est exprimée principalement dans les veines pathologiques, elle est exprimée dans 8/10 échantillons de veines pathologiques contre 2/10 échantillons de veines saines. L'expression de cette enzyme est plus importante dans les veines pathologiques comparée aux veines saines. L'étude statistique par le test de Wilcoxon montre que cette différence est significative et de l'ordre de 2.

### 1.3. Expression des NO synthases.

Le NO occupant une place importante dans la régulation du tonus vasculaire, nous avons également étudié l'expression des NO synthases « endothéliales » et « inductible » dans les échantillons veineux.

Les NO synthases « endothéliale » et « inductible » n'ont pas été détectées dans nos échantillons par comparaison avec un témoin positif : les cellules endothéliales ECV304. Les résultats sont présentés sur la figure 35.



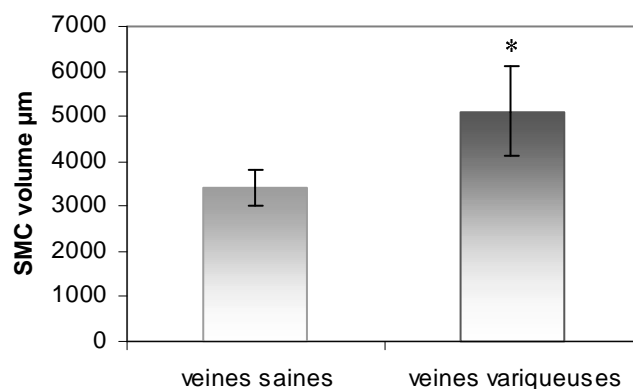
**Figure 35:** Expression de la NO synthase endothéliale(A) et inductible (B) dans les veines saphènes humaines saines (1 à 10) et pathologiques (A à J). Les cellules ECV304 (Ecv) servent de témoin positif.

En conclusion, dans les tissus veineux sains ou pathologiques, nous avons détecté les cytochromes P450 1B1, 2C, 2E1, 2J2, 3A5 et 4A11 avec, pour la plupart d'entre eux, une expression plus importante dans les veines pathologiques. L'étude de 2 types de cyclooxygénases : COX-1 et COX-2, nous a montré que la cyclooxygénase de type 2 est exprimée dans quelques échantillons de veines saines et pathologiques alors que la cyclooxygénase de type 1 n'est exprimée que dans les veines pathologiques. Dans les échantillons de veines saphènes que nous avons testés, nous n'avons détecté ni la NO synthase endothéliale ni la NO synthase inductible.

## **2. Volume des cellules musculaires lisses issues des tissus des veines saphènes**



Comme évoqué précédemment, à cause de l'importance du remodelage vasculaire dans les parois des veines variqueuses, le volume des cellules musculaires lisses a été comparé dans les parois des veines saines et variqueuses. Le volume des cellules musculaires lisses a été mesuré dans 10 veines saines et 10 veines variqueuses. Le volume correspond à la moyenne du volume de 6 cellules prises au hasard dans la coupe histologique. Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de M Kockx et nous avons bénéficié des résultats. Les résultats présentés sur la figure 36 représentent la moyenne obtenue pour 10 veines saines et 10 veines pathologiques.



**Figure 36** : Mesure du volume des cellules musculaires lisses dans des veines saines et pathologiques. Les études statistiques sont réalisées au moyen du test de Wilcoxon (\*,  $p < 0.05$ ).

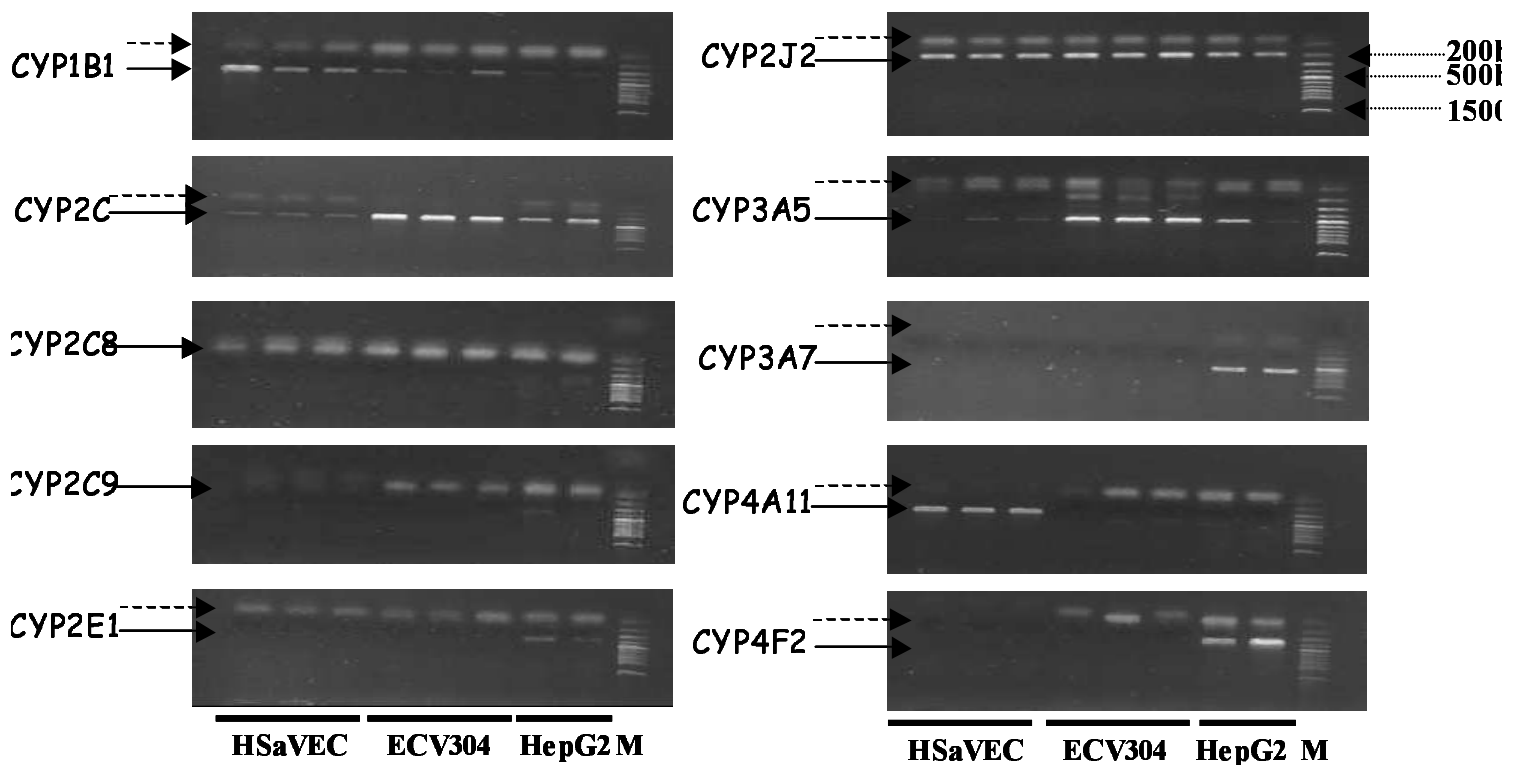
Nous constatons que le volume des cellules mesuré dans les veines variqueuses est 1,4 fois plus important que celui mesuré dans les veines saines. Des études de corrélation seront nécessaire afin d'examiner la possible relation entre l'augmentation du volume des cellules musculaires lisses et l'augmentation de l'expression de certains cytochromes P450 vasculaires.

### 3. Expression des enzymes vaso-actives dans les cellules humaines (*Publication n°2*).

#### 3.1. Les cellules endothéliales.

### 3.1.1. Les cytochromes P450.

L'expression génomique de 12 cytochromes P450 et de deux cyclooxygénases a été étudiée dans des cultures primaires de cellules de veines saphènes : les cellules HSaVEC (produits de RT dilués au dixième) et dans la lignée cellulaire ECV304. Cette étude a été validée par l'utilisation d'une lignée cellulaire bien connue au laboratoire : la lignée d'hépatoblastomes humains HepG2. Trois cultures différentes ont été réalisées pour les cellules HSaVEC et ECV304, seules deux cultures ont été utilisées pour les cellules témoins HepG2. Les produits de PCR obtenus pour chaque culture sont représentés sur la figure 37.

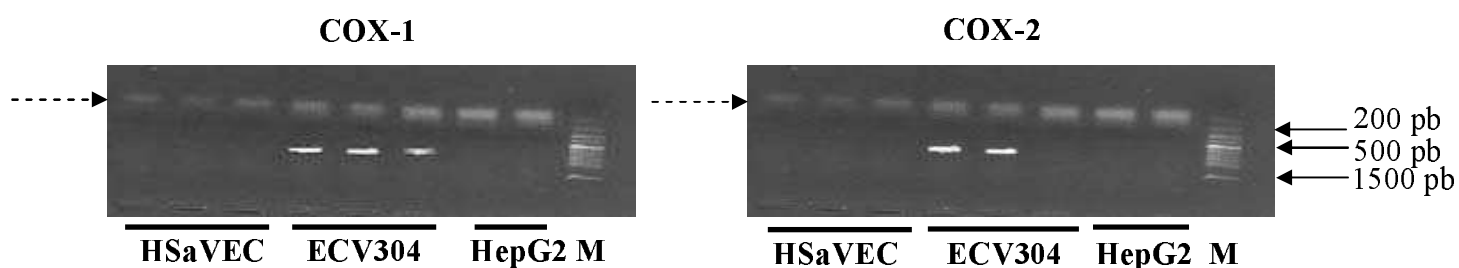


*Figure 37 : Expression des cytochromes P450 1B1, 2C total, 2C8, 2C9, 2E1, 2J2, 3A5, 3A7, 4A11 et 4F2 dans les cellules endothéliales de veines saphènes en culture primaire (HSaVEC)(produits de RT dilués au dixième) et dans les cellules endothéliales en lignée (ECV304). Les cellules d'hépatoblastome humain HepG2 (Hep) servent de témoin positif. Le marqueur de taille est symbolisé par M, les tailles de bas en haut sont 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 et 100 pb. Les flèches en pointillés indiquent les primers dimers.*

Les cytochromes P450 1B1, 2C, 2C8, 2J2 et 3A5 sont exprimés dans les deux lignées de cellules endothéliales. Le CYP2C9 est exprimé uniquement dans les cellules ECV304 alors que le cytochrome P450 4A11 n'est exprimé que dans les cellules HSaVEC. Les cytochromes P450 2E1, 3A7 et 4F2 ne sont exprimés dans aucune des cultures de cellules endothéliales.

### 3.1.2. Les cyclooxygénases.

Les expressions de deux types de cyclooxygénases, la cyclooxygénase de type 1 et le cyclooxygénase de type 2 ont été étudiées dans des cellules endothéliales humaines par comparaison aux cellules d'hépatoblastome humain, les cellules HepG2. Les résultats sont présentés sur la figure 38.

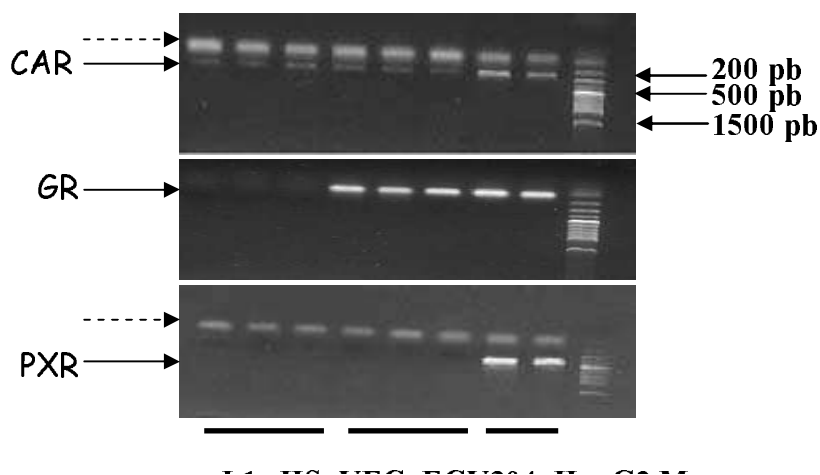


**Figure 38:** Représentation des bandes correspondant aux produits de PCR obtenus pour les gènes des cyclooxygénase de type 1 (COX-1) et cyclooxygénase de type 2 (COX-2) dans les cultures de cellules endothéliales (HSaVEC et ECV304) et de cultures de cellules d'hépatoblastome HepG2. M correspond au marqueur de taille, il représente l'ADN double brin de 100 à 1500 paires de bases. Le marqueur consiste en 11 fragments de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 et 1500 paires de bases. Les flèches en pointillés indique les primers dimers.

Ces résultats montrent que les deux types de cyclooxygénases ne sont exprimées que dans les cellules endothéliales ECV304, elles n'ont pas été détectées ni dans les cellules HSaVEC ni dans les cellules HepG2.

### 3.1.3. Les récepteurs nucléaires.

Les principaux récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation des cytochromes P450 sont le récepteur PXR (*Pregnane X Receptor*), le récepteur CAR (*Constitutif Androstane Receptor*) et le récepteur GR (*Glucocorticoid Receptor*). Nous avons étudié l'expression de ces récepteurs dans les cultures de cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses par comparaison avec la lignée hépatoblastique, les résultats sont présentés sur la figure 39.



**Figure 39 :** Expression de 3 récepteurs nucléaires : CAR (Constitutive Androstane Receptor), PXR (Pregnane X Receptor) et GR (Glucocorticoid Receptor) dans trois cultures cellulaires : cellules endothéliales de veines saphènes humaines (HSAVEC), cellules endothéliales humaines (ECV304), cellules d'hépatoblastome humain (HepG2), « M » représente le marqueur de taille (de bas en haut : 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 paires de bases). Les flèches en pointillés indiquent les primers dimers.

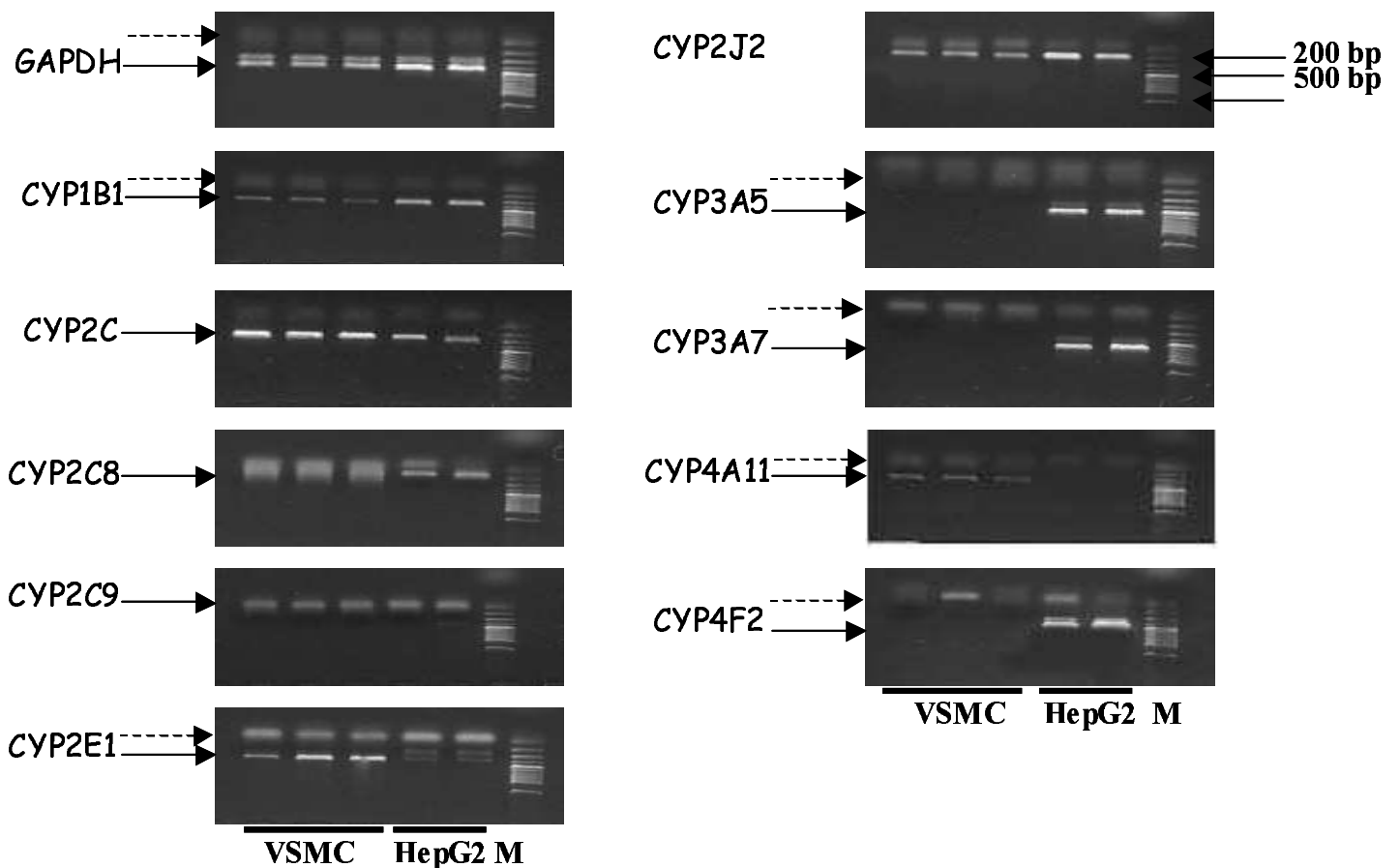
**Le récepteur nucléaire CAR est exprimé dans toutes les cultures de cellules, le récepteur nucléaire des glucocorticoïdes GR n'est exprimé que dans la lignée de cellules endothéliales ECV304 et la lignée de cellules d'hépatomes humains HepG2. Le récepteur PXR quant à lui n'est exprimé que dans la lignée de cellules HepG2.**

*Les cellules endothéliales issues d'un échantillon de veine saphène humaine expriment les cytochromes P450 1B1, 2C, 2C8, 2J2, 3A5 et 4A11. Elles n'expriment pas les cytochromes P450 2C9, 2E1, 3A7 et 4F2. Les cellules ECV304 expriment les cytochromes P450 1B1, 2C, 2C8, 2C9, 2J2 et 3A5. Elles n'expriment pas les cytochromes P450 2E1, 3A7, 4A11 et 4F2. Excepté pour le cytochrome P450 4A11, les cellules HSAVEC et les cellules ECV304 ont le même profil d'expression pour les cytochromes P450 vasculaires. Seules les cellules ECV304 expriment les deux cyclooxygénases étudiées COX-1 et COX-2. Les cellules HSAVEC expriment le récepteur nucléaire CAR mais ni le récepteur GR ni le récepteur PXR n'ont été détectés dans les cultures de cellules HSAVEC testées. En revanche, les cellules ECV304 expriment les récepteurs CAR et GR mais pas PXR.*

### **3.2. Les cellules musculaires lisses.**

### 3.2.1. Les cytochromes P450.

Les expressions des ARNm de 10 cytochromes P450 et du gène domestique de la GAPDH ont été étudiées par la technique de RT-PCR sur des cultures primaires de cellules musculaires lisses provenant d'aortes thoraciques humaines généreusement offertes par le Laboratoire du Professeur J. Bonnet, (INSERM U441, Bordeaux, Pessac). Les cellules d'hépatoblastome humain, HepG2, exprimant la plupart des cytochromes P450 étudiés, nous servent de témoin. Les ARNm de trois cultures de cellules musculaires lisses et de deux cultures de cellules HepG2 ont été utilisés. Les résultats sont présentés sur la figure 40.



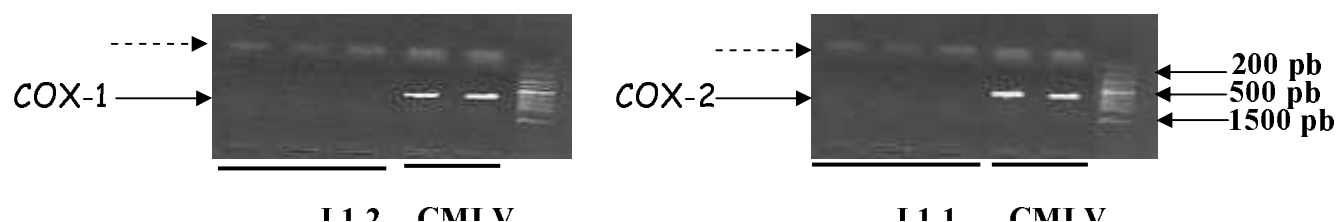
**Figure 40 :** Représentation des bandes correspondant aux produits de PCR obtenus pour chaque gène dans les cultures primaires de cellules musculaires lisses (CMLV) et de cultures de cellules d'hépatoblastome HepG2. M correspond au marqueur de taille (de bas en haut : 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 paires de bases). Les flèches en pointillés indiquent les primers dimers.

**Le gène domestique de la GAPDH est exprimé dans toutes les cultures de cellules. Les cytochromes P450 1B1, 2C total, 2C9, 2E1 et 2J2 sont également exprimés dans toutes**

*les cultures de cellules musculaires lisses. Les cytochromes P450 2C8, CYP3A5, CYP3A7 et CYP4F2 n'ont pas été détectés dans cette lignée de cellules musculaires lisses.*

### 3.2.2. Les cyclooxygénases.

L'expression des deux types de cyclooxygénases étudiées précédemment ont été étudiées dans les cultures primaires de cellules musculaires lisses. Pour cette étude, nous avons utilisé les cellules endothéliales ECV304 comme témoins positifs. Les résultats sont présentés sur la figure 41.



**Figure 41:** Expression des deux types de cyclooxygénases : COX-1 et COX-2 dans les cultures primaires de cellules musculaires lisses (CML) et dans la lignée de cellules endothéliale, ECV304.

**Les cellules musculaires lisses n'expriment aucune des cyclooxygénases étudiée.**

### 3.2.3. Les récepteurs nucléaires.

Comme pour les cellules endothéliales, nous avons recherché la présence des principaux récepteurs nucléaires : CAR, GR et PXR, dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Les résultats sont présentés sur la figure 42.



---

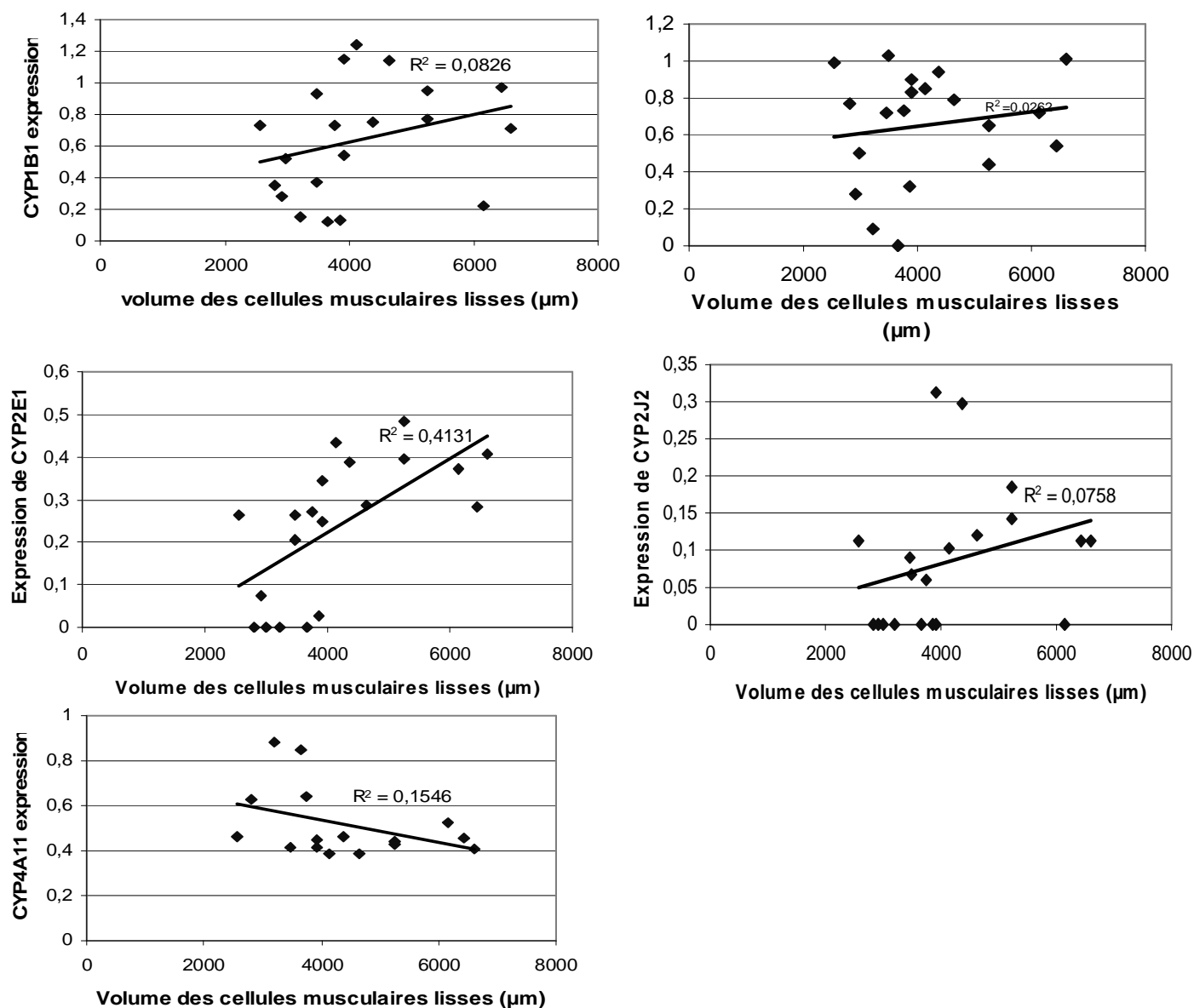
**Figure 42 :** Expression de 3 récepteurs nucléaires : CAR (Constitutive Androstane Receptor), PXR (Pregnane X Receptor) et GR (Glucocorticoid Receptor) dans des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et dans des cellules d'hépatoblastome humain (HepG2), « M » représente le marqueur de taille (de bas en haut : 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 paires de bases). Les flèches en pointillés indiquent les primer dimers.

Les récepteurs CAR et GR sont exprimés dans les cellules musculaires lisses et dans la lignée de cellules témoin, les cellules HepG2. Le récepteur PXR quant à lui n'est présent que dans les cellules HepG2.

Les cellules musculaires lisses expriment les cytochromes P450 1B1, 2C, 2C9, 2E1, 2J2 et 4A11. Les cytochromes P450 2C8, 3A5, 3A7 et 4F2 n'ont pas été détectés dans ce type de cellules. Les récepteurs CAR et GR sont présents dans les cellules musculaires lisses mais le récepteur PXR n'a pas été détecté.

#### **4. Etudes de corrélations.**

Compte tenu des résultats précédents montrant la présence des cytochromes P450 1B1, 2C, 2E1, 2J2 et 4A11 dans les cellules musculaires lisses humaines, nous avons vérifié si l'augmentation du taux de cytochromes P450 dans les échantillons de veines variqueuses est ou non lié à l'augmentation du volume des cellules musculaires lisses, nous avons corrélé le taux d'expression, dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses, des cytochromes P450 1B1, 2C, 2E1, 2J2 et 4A11 qui sont exprimés dans les cellules musculaires lisses et le volume cellulaire. les résultats sont présentés sur la figure 43.



**Figure 43 :** Corrélations entre le volume des cellules musculaires lisses et le taux d'expression des cytochromes P450 1B1, 2C, 2E1, 2J2 et 4A11.

Ces graphiques montrent que le taux d'expression de cytochromes P450 exprimés dans les cellules musculaires lisses n'est pas relié au volume cellulaire. En effet, la répartition semble être totalement aléatoire, il semble donc que l'augmentation de l'expression de ces cytochromes P450 notamment les CYP1B1, CYP2E1 et CYP2J2 dont la différence d'expression entre les veines saines et pathologiques est très marquée, ne soit pas liée au volume des cellules musculaires lisses.

## 5. Discussion.



L'expression de certaines enzymes impliquées dans la formation de métabolites vaso-actifs tels que les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) et les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) a été étudiée dans des échantillons de veines saphènes humaines et dans des cultures cellulaires humaines. Cette étude s'intéressera plus particulièrement à l'expression des cytochromes P450, des cyclooxygénases et de deux NO synthases.

### **1. Place des enzymes vaso-actives dans la pathologie variqueuse.**

Nous avons tout d'abord observé l'expression des enzymes vaso-actives dans les veines saphènes humaines. Dans cette première partie, nous avons observé que l'expression des cytochromes P450 1B1, 2C, 2E1, 2J2 et 3A5 était plus élevée dans les échantillons de veines variqueuses que dans les échantillons de veines saines. L'expression des cyclooxygénases notamment l'expression de la cyclooxygénase de type 2 est également augmentée dans la pathologie variqueuse. Dans les conditions que nous avons utilisées, nous n'avons pas détecté de NO synthase ni dans les veines saines ni dans les veines pathologiques, leur expression est probablement trop faible pour être détectée dans les conditions utilisées.

Les résultats obtenus pour les volumes des cellules musculaires lisses nous montrent une hypertrophie des cellules musculaires lisses dans les veines variqueuses.

Les variations interindividuelles de ces enzymes vaso-actives observées dans les différents échantillons ne peuvent pas s'expliquer par les différences d'âge et de sexe. En effet, une étude a précédemment démontré que ni l'âge, ni le sexe n'avaient d'influence sur les expressions et les activités des cytochromes P450 (Schmucker *et al.*, 1990). Par ailleurs, ces différences individuelles ne proviennent pas des différents traitements pris par les patients. Parmi les molécules utilisées, seule l'atorvastatine pourrait avoir un effet sur les expressions des cytochromes P450. En effet, il a été démontré que l'atorvastatine pouvait moduler l'expression des cytochromes P450 de la famille 3A mais également celle du CYP2C9 (Kocarek *et al.*, 2002 ; Scripture *et al.*, 2001 ; Cohen *et al.*, 2000). Ces données suggèrent que l'expression de CYP3A5 et CYP2C pourrait être modulée pour les patients traités par l'atorvastatine. Cependant, par comparaison avec les autres échantillons de veines saphènes, aucune différence significative concernant les CYP2C et CYP3A5 pour les échantillons provenant des patients traités par l'atorvastatine n'est observée.

Dans la pathologie variqueuse, il est clairement démontré que les veines variqueuses présentent une forte modification de la paroi (Badier-Commander *et al.*, 2001), avec un épaissement de la couche appelée media. Ceci est probablement dû à l'augmentation du volume cellulaire observé dans les segments de veines variqueuses. Nous avons émis l'hypothèse que la modification des taux d'expression des cytochromes P450 était due à la modification de la composition des parois vasculaires, notamment à l'augmentation du volume des cellules musculaires lisses mais l'étude de corrélation que nous avons effectuée montre qu'il n'en est rien. Il semble plus probable que d'autres facteurs tels que la réaction inflammatoire, l'hypoxie ou le stress mécanique soient en cause dans l'augmentation de l'expression de ces enzymes.

En effet, la réaction inflammatoire est une caractéristique du développement de la pathologie variqueuse (Schaub *et al.*, 2000 ; Beasley *et al.*, 1995) et l'influence des cytokines sur la modification d'activité et d'expression des cytochromes P450 (Morgan, 2001) est largement décrite. La plupart des études ont démontré l'effet inhibiteur des cytokines sur l'activité des cytochromes P450. Par exemple, l'interleukine-6 réprime l'expression du CYP2C9 dans le foie (Pascussi *et al.*, 2000c). Les interleukine-1 $\beta$  et interleukine-6 diminuent l'activité et l'ARNm de CYP4A1 dans les hépatocytes de rat (Parmentier *et al.*, 1993 ; Parmentier *et al.*, 1997). Cependant, il a été démontré que les cytokines pouvaient également augmenter l'expression des cytochromes P450 c'est le cas notamment du CYP1B1 dont l'expression est augmentée après traitement par le TNF- $\alpha$  (Piscaglia *et al.*, 1999) et l'interleukine-1 $\beta$  (Malaplate-Armand *et al.*, 2003).

Il a également été démontré que l'hypoxie augmente l'activité de certains cytochromes P450. En effet, l'expression de CYP2B1 est augmentée dans les condition hypoxiques chez les rats (Bayanov *et al.*, 1999) et la protéine CYP2C9 est augmentée dans les artères mésentériques de rat dans les conditions d'hypoxie chronique (Earley *et al.*, 2003). Le stress mécanique est également responsable de la modification de certains cytochromes P450. En effet, l'expression et l'activité des cytochromes P450 de la famille 2C sont augmentés à la suite d'un stress mécanique (Fisslthaler *et al.*, 2001).

L'expression de CYP2J2, fortement influencée par la pathologie variqueuse, n'est pas augmentée par l'hypoxie. En effet, Marden *et al.*, (2003) ont démontré que les conditions hypoxiques diminuent l'expression de CYP2J2 dans les cellules HepG2. Toutefois, cette étude a été réalisée dans des cellules provenant de foie humain, nous ne pouvons donc pas

écarter l'hypothèse que l'hypoxie ait un effet inverse dans les cellules vasculaires telles que les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses. Aucune étude ne concerne l'effet du stress mécanique et des cytokines sur l'expression de ce cytochrome P450, il est donc possible que la réaction inflammatoire ainsi que le stress mécanique modulent l'expression de CYP2J2. Le CYP3A5 est celui qui présente la plus forte différence d'expression entre les veines saines et variqueuses. Aucune donnée ne décrit l'effet des conditions hypoxiques et du stress mécanique sur l'expression de ce cytochrome P450.

Les études concernant l'effet des cytokines sur l'expression des cytochromes P450 de la famille 3A, décrivent un effet répresseur des interleukine 1 $\alpha$  (Muntane-Relat *et al.*, 1995), interleukine-2 (Elkhwaji *et al.*, 1999) et interleukine-6 (Jover *et al.*, 2002). Des études supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer si les conditions hypoxiques et le stress mécanique pourraient intervenir dans l'augmentation de l'expression de ces deux cytochromes P450 dans la pathologie variqueuse.

Les cytochromes P450 de la famille 2C ne sont pas les cytochromes dont l'expression est la plus affectée par la pathologie variqueuse et cela malgré la grande importance des cytochromes P450 de la famille 2C et plus précisément de CYP2C9 dans le métabolisme de l'acide arachidonique.

Le cytochrome 4A11, bien que les résultats ne soient pas significatifs a tendance à être réprimé dans la pathologie variqueuse. La diminution du taux de CYP4A11 pourrait s'expliquer par la réaction inflammatoire. En effet, les interleukines-6 et 1 $\beta$  diminuent l'activité et le taux d'ARNm de CYP4A1 dans les hépatocytes de rat (Parmentier *et al.*, 1993 ; Parmentier *et al.*, 1997). Toutefois, la diminution de l'expression de CYP4A n'étant pas très importants dans les veines variqueuses, nous pouvons supposer que la dérégulation du tonus vasculaire observé dans la pathologie variqueuse serait due plutôt à un excès de production de molécules vasodilatatrices telles que les EETs qu'à un déficit de synthèse de composés vasoconstricteurs tels que les HETEs.

Dans cette étude, nous avons également démontré que l'expression des cyclooxygénases notamment la cyclooxygénase de type 2 était plus importante dans les veines variqueuses que dans les veines pathologiques. Ces différences peuvent également être la conséquence de la réaction inflammatoire ou de l'hypoxie observées dans la pathologie variqueuse. En effet, les cytokines (Vane *et al.*, 1998 ; Bishop-Bailey *et al.*, 1999 ; Stanford *et al.*, 2000) et les conditions hypoxiques augmentent l'expression protéique de la cyclooxygénase de type 2 (Demasi *et al.*, 2003).

## **2. Expression des enzymes vaso-actives et des récepteurs nucléaires dans les cellules vasculaires.**

Les cellules musculaires lisses sont les constituants principaux de la média dans la paroi veineuse. Ces cellules ont un double rôle contractile et sécrétoire, elles participent au remodelage vasculaire en proliférant et produisant de la matrice extra-cellulaire. Ce processus est une réponse adaptative soit vers un élargissement soit vers une réduction du calibre veineux. Les veines variqueuses diffèrent des veines saphènes normales par la présence d'une couche musculaire lisse hypertrophiée et la désorganisation de l'élastine. Le diamètre de la couche musculaire lisse des veines variqueuses est plus élevé que celui des veines saines (Badier-Commander *et al.*, 2001). Cette hypertrophie des cellules musculaires lisses pourrait être à l'origine de la rupture des fibres d'élastine et de la fragilisation des parois vasculaires.

Les cellules endothéliales régulent de nombreuses fonctions vasculaires. Elles contrôlent la structure vasculaire et assure la quiescence des cellules musculaires lisses. L'endothélium contrôle le tonus vasculaire en libérant les composants d'un équilibre vasomoteur : d'une part les éléments vasodilatateurs tels que la prostacycline, le monoxyde d'azote et les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) et d'autre part, l'endothéline et les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs). L'endothélium joue un rôle important dans la transmission de l'information à partir du sang vers la paroi veineuse sous jacente. Toutes ces propriétés lui confèrent un rôle dans certaines circonstances pathologiques associées à l'inflammation aiguë et aux désordres cardio-vasculaires.

Compte tenu de l'importance des ces deux types cellulaires dans la paroi veineuse et notamment dans la régulation du tonus vasculaire, nous avons étudié l'expression des cytochromes P450 et des cyclooxygénases dans différents types cellulaires. L'utilisation de culture primaires de cellules endothéliales vasculaires et de cellules musculaires lisses vasculaires, nous a permis de montrer que les cytochromes P450 1B1, 2C9, 2J2 et 4A11 étaient présents dans les deux types cellulaires. Les cytochromes P450 3A7 et 4F2 quant à eux n'ont été détectés dans aucune des deux types de cellules endothéliales et musculaires lisses. En revanche, les cytochromes P450 2C8 et 3A5 sont uniquement présents dans les cellules endothéliales et le CYP2E1 dans les cellules musculaires lisses.

### ***2.1. Cellules endothéliales.***

De façon générale, ces résultats sont en accord avec les précédentes études réalisées. En effet, le cytochrome CYP2C8 est exprimé dans les cellules d'artères coronaires de porc (Fisslthaler *et al.*, 2000. Node *et al.*, 1999) quant au cytochrome CYP2C9 il a été détecté dans les artères coronaires de boeuf et de lapin (Rosolowsky *et al.*, 1990, Pinto *et al.*, 1986) ainsi que dans les cellules musculaires lisses d'artères mammaires (Archer *et al.*, 2003). La présence du cytochrome CYP2E1 a été démontrée dans les cellules de veines de cordon ombilical (Farin *et al.*, 1994), de cellules endothéliales d'artères humaines (Thum et Borlak, 2004) et les cellules ECV304 (Hoebel *et al.*, 1998) mais de façon étonnante, nous ne l'avons détecté ni dans les cellules ECV304 ni dans les cellules endothéliales de veines saphènes. Toutefois, nous avons démontré la présence de CYP2E1 dans les tissus de veines saphènes humaines. L'absence de CYP2E1 dans les veines saphènes peut s'expliquer par le fait que l'expression de ce cytochromes P450 n'est pas identique d'un individu à l'autre. En effet, les cellules endothéliales de veines saphènes utilisées pour cette étude proviennent d'un seul individu, ce qui peut expliquer l'absence de CYP2E1 dans ce lot de cellules de veines saphènes humaines. En revanche, l'absence de CYP2E1 dans les cellules ECV304 est étonnante car ce cytochrome P450 est présent dans la plupart des cultures de cellules endothéliales décrites dans la littérature (tableau 1). Le CYP2J2 a été localisé dans l'endothélium vasculaire bronchique (Zeldin *et al.*, 1996) et dans l'endothélium des grandes et petites artères (Node *et al.*, 1999). Les cytochromes P450 de la famille 3A ont été détectés dans plusieurs types de cellules endothéliales : les cellules de cordon ombilical (HUVEC) (Farin *et al.*, 1994), d'artères coronaires porcines et bovines (Hoebel *et al.*, 1998), d'artères linguales de singes (Ayajiki *et al.*, 2003) et dans les lignées de cellules endothéliales ECV304 et Ea.hy926 (Hoebel *et al.*, 1998). L'isoforme CYP3A5 est présent dans l'endothélium vasculaire pulmonaire (Anttila *et al.*, 1997 ; Raunio *et al.*, 1998). La présence des cytochromes P450 de la famille 4A a plutôt été décrite spécifiquement dans les cellules musculaires lisses (Jiang *et al.*, 2004). Cependant, les données de la littérature sont contradictoires car certains auteurs décrivent le présence de CYP4A dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires de rat (Zhu *et al.*, 2002) et dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires bovines (Yu *et al.*, 2002). Dans notre étude, nous avons observé la présence de CYP1B1 dans toutes les cultures de cellules endothéliales, HSaVEC et ECV304 ainsi que dans les cultures de cellules musculaires lisses alors que Zhao *et al.*, (1998) n'ont détecté le CYP1B1 que dans les cellules musculaires lisses mais pas dans les cellules

endothéliales vasculaires d'un seul individu. Il est probable là encore que les résultats varient d'un individu à l'autre.

Les cytochromes P450 décrits dans les cellules endothéliales notamment CYP2C, CYP2C8 , CYP2C9, CYP2J2 et CYP4A11 participent au métabolisme de l'acide arachidonique et forment des molécules vaso-actives telles que les acides epoxyeicosatriénoïques (5,6- ; 8, 9- ; 11, 12- et 14,15-EETs) vasodilatateurs et les acides hydroxyeicosatétraénoïques (principalement le 20-HETE), vasoconstricteurs. Le CYP3A5 réalise la formation d'oxyde nitrique à partir de dérivés nitrés (Minamiyama *et al.*, 1999) mais les cytochromes P450 de la famille 3A sont également impliqués dans la formation d'EETs à partir d'acide arachidonique (Ayajiki *et al.*, 1999, 2003).

## **2.2. Cellules musculaires lisses.**

Les cellules musculaires lisses humaines expriment les CYP1B1, CYP2C total, CYP2C9, CYP2J2 et CYP4A11. Ces résultats sont en accord avec les études réalisées par d'autres auteurs. Le présence de CYP1B1 a été démontrés dans les cellules musculaires lisses d'artères coronaires (Dubey *et al.*, 2003), d'aortes de souris (Moorthy *et al.*, 2003), d'artères cérébrales et d'artères de méninges de rongeurs (Granberg *et al.*, 2003). Les cytochromes P450 de la famille 2C sont exprimés dans les cellules musculaires lisses (Archer *et al.*, 2003). La présence de CYP2J2 a été détectée dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires (Zeldin *et al.*, 1996). Par ailleurs, la présence du cytochrome CYP4A11 dans divers types de cellules musculaires lisses a été bien décrite. En effet, cette enzyme a été détectée dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires de lapin (Zhu *et al.*, 1998 ; Parmentier *et al.*, 2001) et de rat (Zhu *et al.*, 2002).

En résumé, excepté pour le CYP2E1, les expressions des cytochromes P450 dans les cellules endothéliales de veines saphènes et les cellules musculaires lisses vasculaires sont en accord avec les données de la littérature. Ces données sont résumées dans le tableau 1.

La présence de la cyclooxygénase de type 1 a été décrite dans les cellules musculaires lisses et celle de type 2 dans les cellules endothéliales (Komhoff *et al.*, 1997). Toutefois, nous avons observé les deux types de cyclooxygénases uniquement dans les cellules endothéliales ECV304. Nous pouvons supposer que la quantité présente dans les cellules HSaVEC et dans les cellules musculaires lisses n'est pas suffisante pour être détectée dans les conditions que

nous avons utilisées. De plus, dans les études réalisées sur les tissus humains, nous avons détecté les cyclooxygénases de type 1 et 2 principalement dans les veines pathologiques. D'une part, nous pouvons supposer que la cyclooxygénase de type 1 ne soit présente que dans les veines pathologiques et donc pas détectée dans les cultures de cellules musculaires lisses saines. D'autre part, nous pouvons émettre l'hypothèse que dans les veines saphènes humaines, la cyclooxygénase de type 2 ne soit détectée que dans des conditions inflammatoires observées dans la pathologie variqueuse et absentes dans les cultures cellulaires. Les résultats observés dans les cultures cellulaires sont donc concordants avec les résultats obtenus dans les échantillons de veines saphènes humaines.

### ***3. Modulation de l'expression des cytochromes P450 en pathologie vasculaire.***

La fumée de tabac peut être un inducteur des cytochromes P450 notamment CYP2E1 dans le poumon (Villard *et al.*, 1994) et dans le cerveau (Howard *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'expression et l'activité des cytochromes P450 est régulée dans certaines pathologies. En effet, après un arrêt cardiaque, les expressions des CYP2J2, CYP1B1 et CYP2E1 sont augmentées (Tan *et al.*, 2002 ; Aronow *et al.*, 2001). L'obésité favorise l'augmentation de l'expression de CYP2E1 et la diminution de l'expression des cytochromes P450 4A et 2C chez le rat (Wang *et al.*, 2003a). Un régime à forte teneur en sel augmente les protéines des cytochromes P450 2C et diminuent les protéines 4A dans les microvaisseaux rénaux ce qui a pour conséquence l'augmentation de la pression artérielle (Zhao *et al.*, 2003). En plus de ces pathologies, notre travail a également montré que les expressions de certains cytochromes P450 notamment CYP1B1, CYP2J2, CYP2E1 et CYP3A5 étaient augmentées dans la pathologie variqueuse.

### ***4. Cytochromes P450 et radicaux libres.***

Les cytochromes P450 produisent des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) qui peuvent influencer la prolifération cellulaire. CYP2C9 est un générateur de ROS dans les cellules endothéliales (Fleming *et al.*, 2001). Une production excessive de ROS est associée à une induction de différents cytochromes P450 dans différents organes (Paolini *et al.*, 2001). L'insuffisance veineuse chronique et la pathologie variqueuse en général sont associées à une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, principaux responsables des lésions vasculaires (Flore *et al.*, 2003). D'une part, les conditions hypoxiques observées dans la

pathologie variqueuse sont responsables de la production de ROS (Ratyck *et al.*, 1987 ; Zweier *et al.*, 1994). D'autre part, l'accumulation des leucocytes dans la pathologie variqueuse est également une source de production de ROS. Les résultats que nous avons obtenus dans cette partie de notre travail laissent suggérer que l'augmentation de l'expression des cytochromes P450 contribue aussi à la production de ROS, aggravant un peu plus les dommages causés aux parois veineuses par les ROS dans les conditions hypoxiques.

Ces résultats suggèrent aussi que l'utilisation d'inhibiteurs des cytochromes P450 pourrait avoir un effet bénéfique dans le traitement de la pathologie variqueuse. Certains inhibiteurs de cytochromes P450 sont déjà utilisés empiriquement dans la pathologie variqueuse en particulier les flavonoïdes (Hodek *et al.*, 2002). D'autres inhibiteurs sont bien connus : les cytochromes P450 de la famille 1A sont inhibés par un composant majeur du vin, le resveratrol (Ciolino *et al.*, 1999). Il a été démontré que la cimétidine inhibe l'activité de CYP2C chez le rat (Levine *et al.*, 1998), l'hyperforine inhibe le CYP2C9, le CYP3A4 et le CYP2D6 et la biapigénine inhibe les CYP3A4, 2C9 et 1A2 (Obach, 2000), la sylibine inhibe les CYP2E1, CYP3A4 (Zuber *et al.*, 2002), la quercétine et le naringénine inhibent le CYP1A2 (Kang *et al.*, 2004). Enfin, le CYP3A4 est inhibé par les composés contenus dans le jus de pamplemousse tels que le bergapten et la naringénine (Ho *et al.*, 2001). Enfin, certaines statines sont des inhibiteurs de cytochromes P450, par exemple, la fluvastatine est un inhibiteur potentiel de CYP2C9 (Scripture *et al.*, 2001), la lovastatine, l'atorvastatine et la simvastatine sont des inhibiteurs de CYP2C19 et CYP3A4 (Scripture *et al.*, 2001) (Cohen *et al.*, 2000). Depuis quelques années les propriétés pleïotropiques des statines sont très étudiées et leurs bénéfices sont principalement décrits dans les maladies cardio-vasculaires (Corsini *et al.*, 1999 ; Laws *et al.*, 2004). Les statines jouent notamment un rôle dans le tonus vasculaire et plus précisément dans le dysfonctionnement endothélial (Hernandez-Perera *et al.*, 1998).

Compte tenu de l'augmentation des cytochromes P450 dans la pathologie variqueuse et du rôle des statines dans les pathologies cardio-vasculaires, la deuxième partie de ce travail, décrira l'effet de quatre statines sur l'expression de certains cytochromes P450.

## **II. Etude de la régulation des cytochromes P450 2C, 2J2 et 3A5 par les statines (*Publication n°3*).**

### **1. Introduction.**



Certains cytochromes P450 occupent une place dans la régulation du tonus vasculaire. Les résultats obtenus dans la première partie de ce travail suggèrent que les cytochromes P450 auraient un rôle dans la pathologie variqueuse. Compte tenu de la localisation des cytochromes P450 dans les cellules composant les parois des veines saphènes et de l'importance de la régulation de ces enzymes dans différents processus biologiques, nous nous sommes intéressés à la régulation des cytochromes P450 par 4 statines, molécules hypocholestérolémiantes ayant de nombreux effets dits pleïotropiques dans les pathologies cardiovasculaires.

Les inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase ou statines ont il y a plus de dix ans, révolutionné le traitement de l'hypercholestérolémie. Cependant, il semble de plus en plus évident que le bénéfice thérapeutique dépasse celui imputable à la seule baisse du cholestérol circulant puisque les statines, de par leur mode d'action intracellulaire, modulent favorablement l'expression et l'activité de différentes protéines impliquées dans la fonction vasculaire. En effet, les propriétés pleïotropiques de ces molécules sont décrites principalement dans les maladies cardiovasculaires (Bellosta *et al.*, 2000). Des études expérimentales et cliniques, ont montré que les statines ont des propriétés anti-inflammatoires, anti-proliférative, anti-thrombogénique et anti-protéolytique en plus de leur rôle dans le dysfonctionnement endothélial (Laws *et al.*, 2004). En effet, il a été démontré que les statines améliorent les propriétés vasodilatatrices de l'endothélium. Ces molécules diminuent également la vasoconstriction en réduisant la production d'endothéline par l'intermédiaire d'une baisse significative des niveaux de l'ARNm du précurseur de l'endothéline (Hernandez-Perera *et al.*, 2000). Le rôle anti-inflammatoire semble être dû à la réduction des niveaux de la protéine C réactive circulante par ces inhibiteurs de l'HMGCoA réductase (Ridker *et al.*, 1998). Les statines moduleraient également certaines propriétés hémostatiques de l'endothélium (Ambrosi *et al.*, 2000). En effet, elles interviendraient d'une part sur la synthèse d'une molécule vasodilatatrice : le NO notamment par la levée de l'inhibition de la NO synthase (Hernandez-Perera *et al.*, 1998) et d'autre part en réduisant la production d'une molécule aux propriétés vasodilatatrices : l'endothéline, par l'intermédiaire d'une baisse significative des niveaux de l'ARNm du précurseur de l'endothéline (Hernandez-Perera *et al.*, 2000).

Toutefois, l'effet des statines sur la cellule endothéliale semble complexe. En résumé, les statines corrigent le dysfonctionnement de la paroi vasculaire en agissant sur les

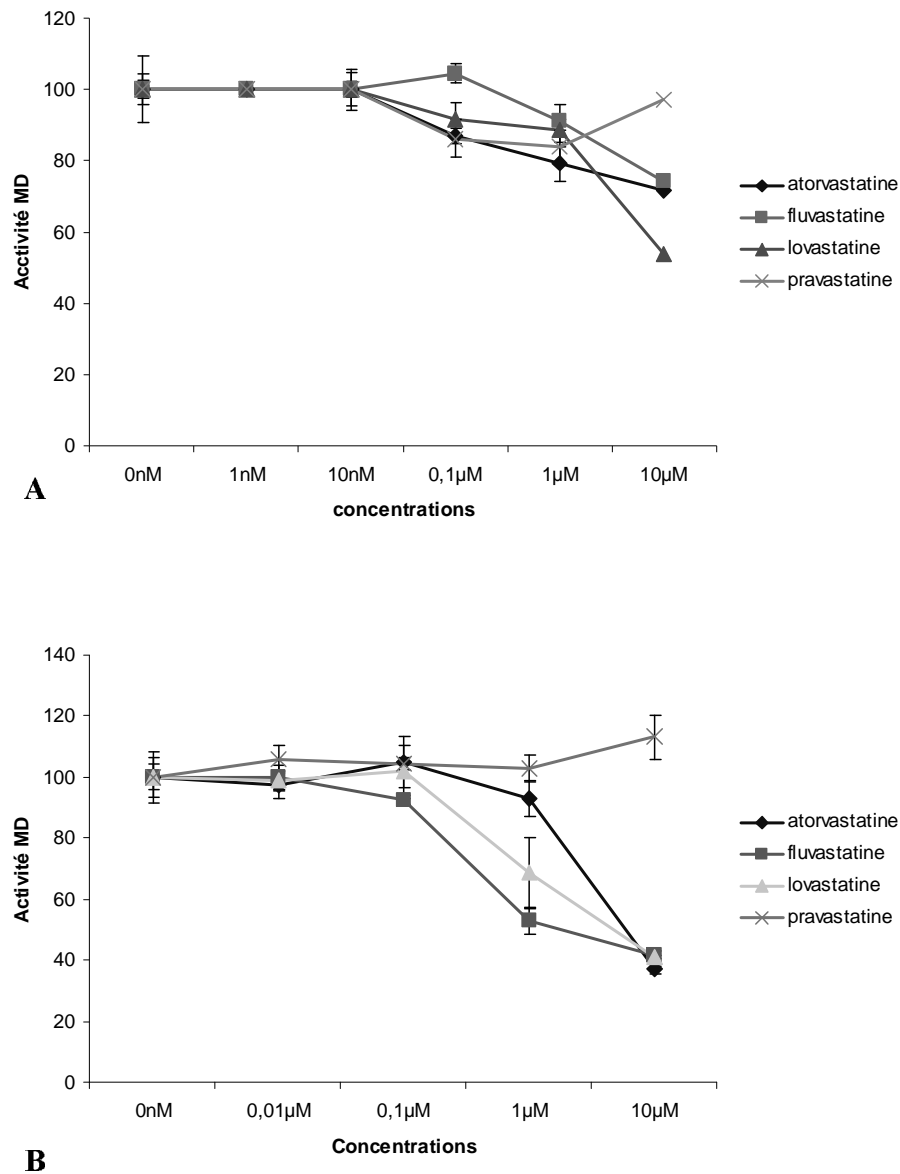
régulations fonctionnelles et sécrétoires de ses principaux constituants cellulaires : cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et macrophages.

Les cellules endothéliales sont la source de production de nombreux composés vaso-dilatateurs et vasoconstricteurs, en partie à cause de la présence d'enzymes vaso-actives telles que les cytochromes P450 et les cyclooxygénases. Les cellules HSaVEC et les cellules ECV304 expriment les cytochromes de la famille 2C mais également les CYP2J2 et CYP3A5. Le modèle cellulaire ECV304 bien que d'origine non vasculaire est de culture simple, c'est pourquoi après avoir vérifié l'expression de ces cytochromes P450 dans les cellules ECV304, nous avons réalisé les études de régulation dans ce modèle cellulaire. Les cytochromes P450 2C étant les enzymes les plus décrites dans l'homéostasie vasculaire (Fisslthaler *et al.*, 1999 ; 2001 ; 2003), nous avons choisi d'étudier la régulation des cytochromes P450 2C total, 2C8 et 2C9. De plus, dans la première partie de ce travail, nous avons constaté que les taux d'expression des CYP2J2 et CYP3A5 étaient les plus influencés par la pathologie variqueuse. Nous nous sommes donc intéressés aussi à la régulation de ces cytochromes par les statines dans les cellules endothéliales.

Compte tenu du rôle des statines dans les pathologies vasculaires et dans la régulation de certains cytochromes P450 (Schuetz *et al.*, 1994 ; Cohen *et al.*, 2000 ; Fisslthaler *et al.*, 2003). Nous nous sommes intéressés à l'effet de ces molécules sur l'expression des cytochromes P450 des familles 2C, 2J et 3A. Dans un premier temps, ces études ont été réalisées dans un modèle cellulaire bien connu au laboratoire et couramment utilisé pour les études de régulation, la lignée de cellules d'hépatoblastomes humaines, les cellules HepG2. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé les mêmes études de régulation dans la lignée de cellules endothéliales ECV304.

## **2. Cytotoxicité *in vitro* des statines.**

Afin de connaître l'effet des statines vis-à-vis de la viabilité cellulaire, nous avons réalisé un test de cytotoxicité : le test du MTT dans les deux lignées cellulaires. Les résultats sont présentés sur la figure 44.



**Figure 44** : Test de cytotoxicité de 4 statines dans les cultures cellulaires HepG2 (A) et ECV304 (B). Le test utilisé est le test MTT qui mesure l'activité mitochondriale deshydrogénase (MD).

Ces résultats montrent que dans les deux lignées cellulaires la pravastatine n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire quelle que soit la concentration utilisée. Dans la lignée cellulaire HepG2, seule la lovastatine à la concentration de 10 µM provoque une mort cellulaire de 50%. En revanche, dans la lignée cellulaire ECV304, la fluvastatine et la

lovastatine entraînent une mort cellulaire à partir de la concentration 1  $\mu\text{M}$ , en effet, la viabilité cellulaire n'est plus que de 60%. L'atorvastatine quant à elle est toxique pour les cellules ECV304 à la concentration de 10  $\mu\text{M}$  avec une viabilité cellulaire de 40%.

Compte tenu de ces résultats, dans la suite de notre étude, seules les concentrations de 0,01 ; 0,1 et 1  $\mu\text{M}$  seront utilisées pour la lignées de cellules ECV304 uniquement.

### 3. Effet des statines sur l'expression des cytochromes P450.

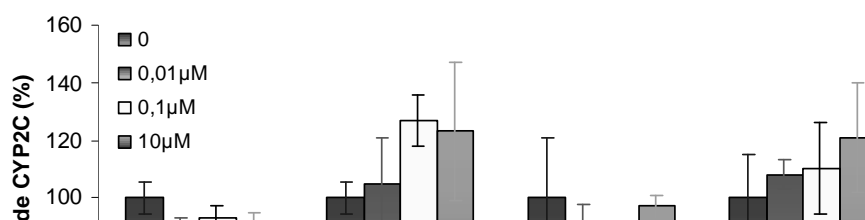
En dehors du foie et des cellules provenant de cet organe, peu d'études sont réalisées dans d'autres systèmes cellulaires, notamment, dans les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont la source de production de nombreux composés vaso-actifs, en partie à cause de la présence d'enzymes vaso-actives telles que les cytochromes P450 et les cyclooxygénases. Au vu de l'importance de la régulation des cytochromes P450, il nous a semblé important de réaliser quelques études de régulation dans les cellules endothéliales pour les cytochromes P450 et plus particulièrement les CYP2C, CYP2J2 et CYP3A5.

#### 3.1. Les cytochromes P450 de la famille 2C.

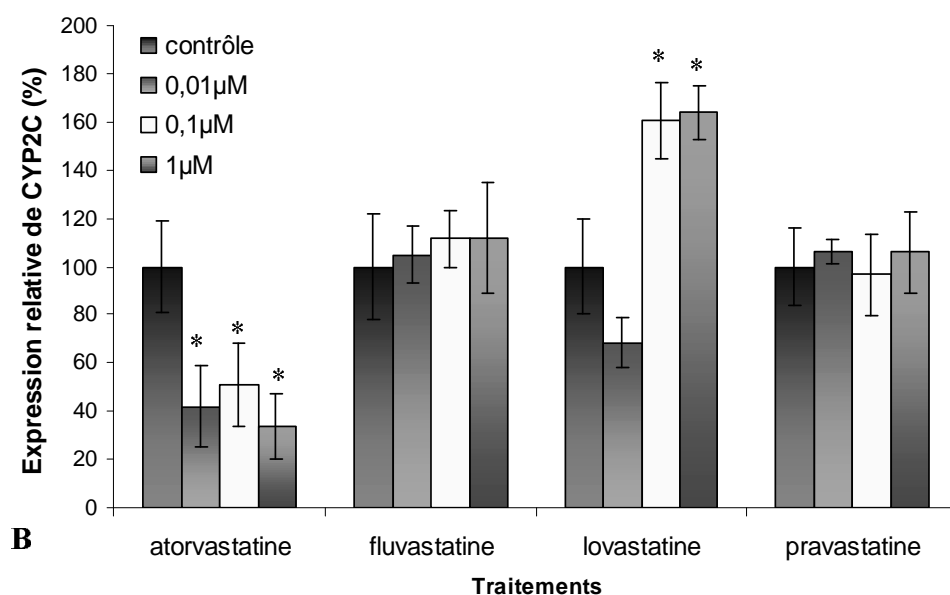
Les cytochromes P450 de la famille 2C étant après les cytochromes P450 de la famille 3A les cytochromes P450 quantitativement les plus abondants, nous avons réalisé cette étude en comparaison avec la lignée d'hépatoblastomes humains, les cellules HepG2.

##### 3.1.1. Le cytochrome P450 2C total.

L'effet de 4 statines de générations différentes sur l'expression des ARNm des cytochromes de la famille 2C a été testé dans les lignées cellulaires HepG2 et ECV304. Les résultats sont présentés sur la figure 45.



A



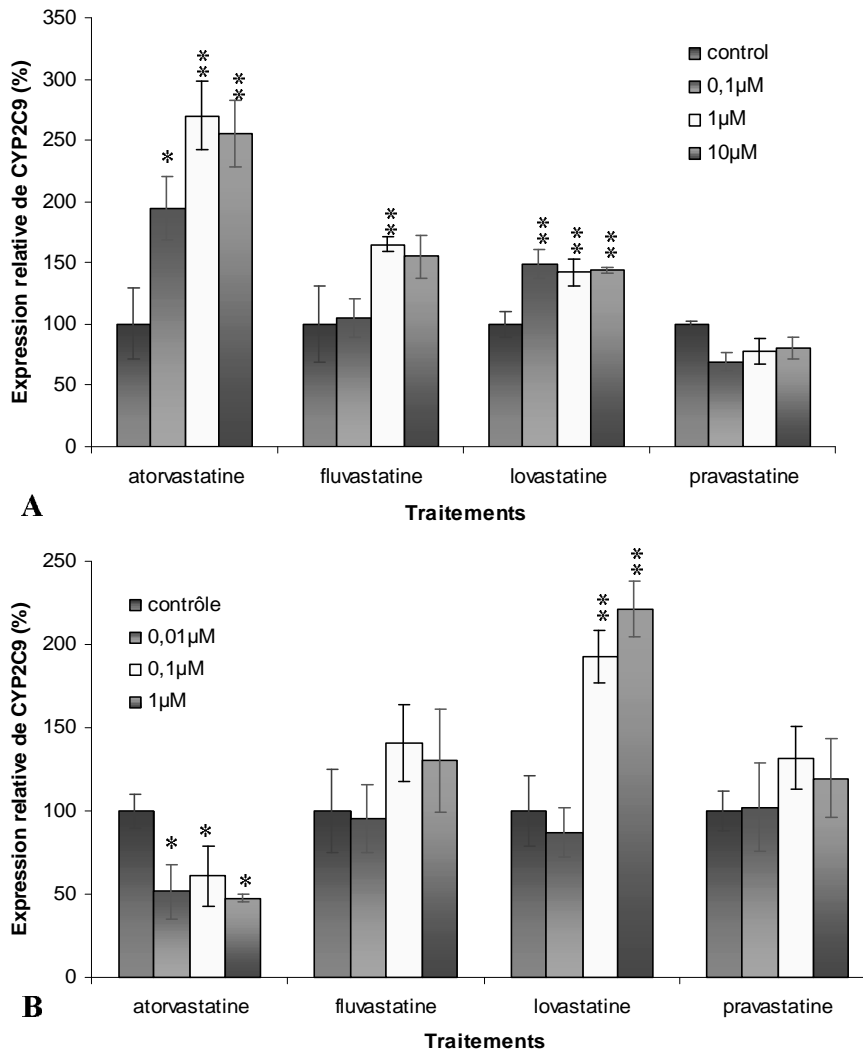
B

**Figure 45** : Effet de 4 statines (atorvastatine, fluvastatine, lovastatine et pravastatine) sur l'expression du CYP2C après 72 heures de traitement dans les cellules HepG2 (A) et ECV304 (B). Les cellules « contrôle » sont des cellules non traitées. (\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

L'effet des statines n'est pas le même selon la lignée cellulaire étudiée et l'effet de chaque statine n'est pas identique. En effet, l'atorvastatine et la pravastatine n'ont pas d'effet sur l'expression du CYP2C total dans les cellules HepG2 alors que dans les cellules ECV304, ce sont la fluvastatine et la pravastatine qui ne présentent aucun effet. Dans les cellules HepG2, la fluvastatine induit le CYP2C total de 1,3 fois à la concentration de 1 µM alors que la lovastatine diminue l'expression de ce cytochrome P450 de 1,4 fois pour la même concentration. En revanche, dans les cellules ECV304, l'atorvastatine diminue l'expression de CYP2C total de 2 fois pour toutes les concentrations testées alors que la lovastatine induit l'expression de cette enzyme de 1,7 fois pour les concentrations 0,1 et 1 µM.

### 3.1.2. Le cytochrome P450 2C9.

Les résultats obtenus pour le CYP2C total n'étant pas homogènes, nous avons cherché à étudier plus précisément l'effet des 4 statines sur l'expression des ARNm du CYP2C9 dans les lignées cellulaires HepG2 et ECV304. Les résultats sont présentés sur la figure 46.



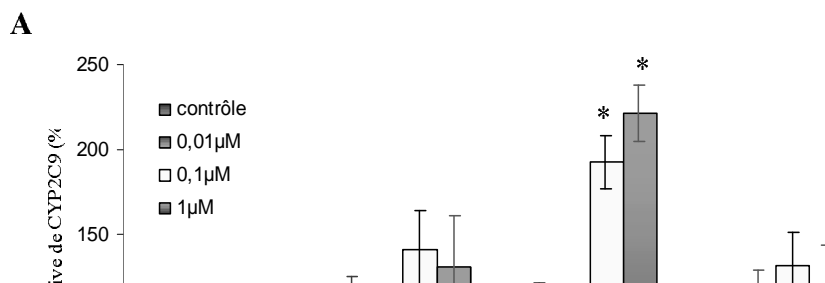
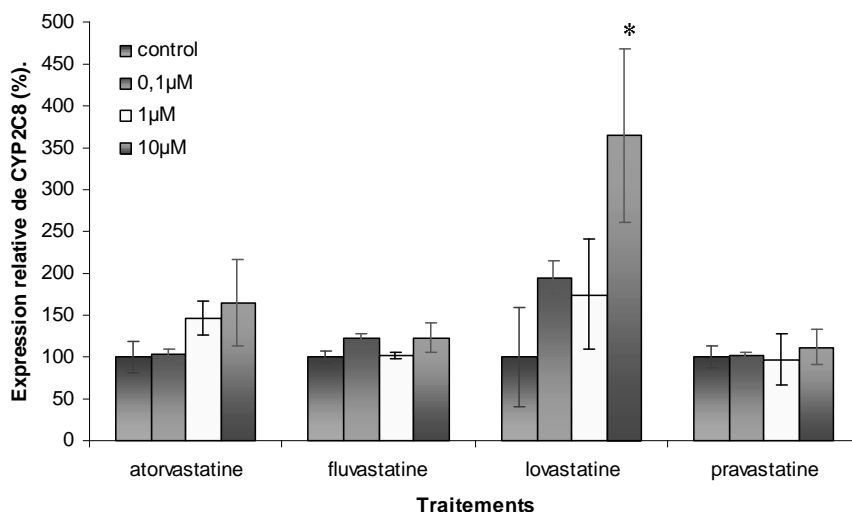
**Figure 46** : Effet de 4 statines (atorvastatine, fluvastatine, lovastatine et pravastatine) sur l'expression du CYP2C9 après 72 heures de traitement dans les cellules HepG2 (A) et ECV304 (B). Les cellules « contrôle » sont des cellules non traitées. (\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

Ces résultats montrent que la pravastatine n'a pas d'effet sur l'expression de CYP2C9 quelle que soit la concentration de statine utilisée et la lignée cellulaire. La fluvastatine et la lovastatine induisent l'expression de CYP2C9 aux concentrations de 1 et 10  $\mu\text{M}$  pour les cellules HepG2 et de 0,1 et 1  $\mu\text{M}$  pour les cellules ECV304. L'augmentation est de 1,7 et 1,5

fois pour la fluvastatine dans les cellules HepG2 et ECV304 respectivement et l'augmentation est de 1,5 et 2 fois pour la lovastatine dans les cellules HepG2 et ECV304 respectivement. En revanche, l'atorvastatine augmente l'expression de CYP2C9 de 2 et 2,5 fois dans les cellules HepG2 aux concentrations 0,1  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$  respectivement. Dans les cellules ECV304, l'atorvastatine diminue l'expression de CYP2C9 de 2 fois environ pour toutes les concentrations testées.

### 3.1.3. Le cytochrome P450 2C8.

Comme précédemment pour le CYP2C9, nous avons étudié plus précisément l'expression du CYP2C8 dans les cellules HepG2 et ECV304. Les résultats sont présentés sur la figure 47.



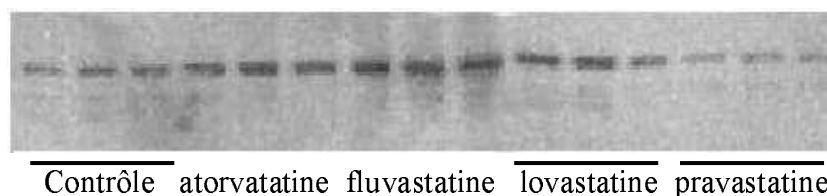
**B**  
**B**

**Figure 47 :** Effet de 4 statines (atorvastatine, fluvastatine, lovastatine et pravastatine) sur l'expression du CYP2C8 après 72 heures de traitement dans les cellules HepG2 (A) et ECV304 (B). Les cellules « contrôle » sont des cellules non traitées. (\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

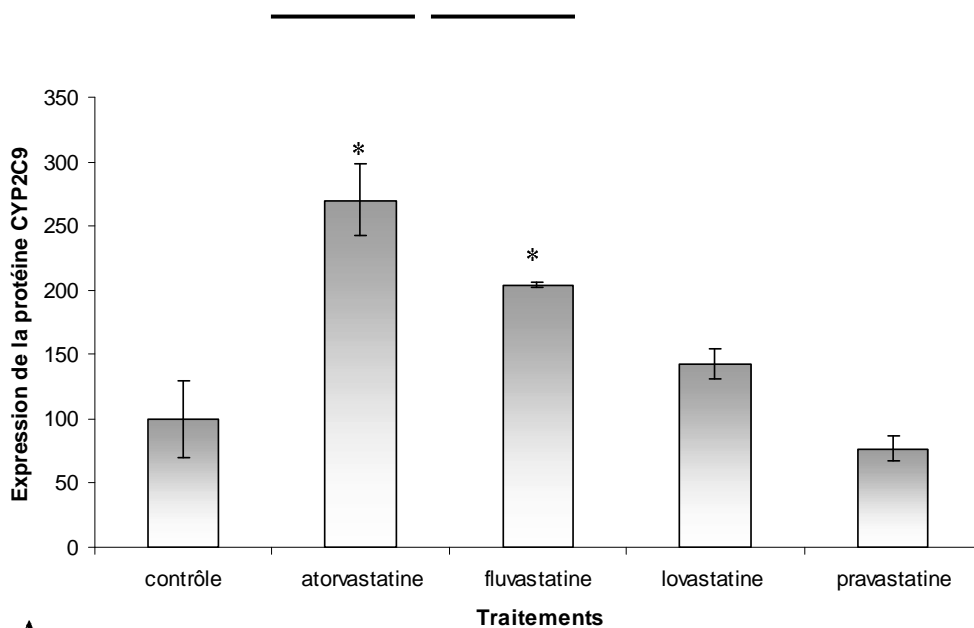
Dans la lignée HepG2, l'expression du CYP2C8 n'est pas modifiée par la fluvastatine et la pravastatine quelles que soient les concentrations utilisées. En revanche, la lovastatine augmente l'expression de CYP2C8 dans les deux types de cultures HepG2 et ECV304. L'augmentation la plus importante est observée avec une concentration de 10  $\mu\text{M}$  dans les cellules HepG2 et de 1  $\mu\text{M}$  dans les cellules ECV304. Avec la lovastatine, l'expression de l'ARNm de CYP2C8 est augmentée de 1,8 fois dans les cellules ECV304 et de 3,5 fois dans la lignée HepG2. L'atorvastatine augmente l'expression de l'ARNm de CYP2C8 de 1,6 fois dans les cellules HepG2 pour la concentration 10  $\mu\text{M}$  alors que ce composé diminue l'expression de CYP2C8 de 3 fois pour toutes les concentrations testées dans les cellules ECV304.

### 3.1.4. Etude de l'expression de la protéine de CYP2C9.

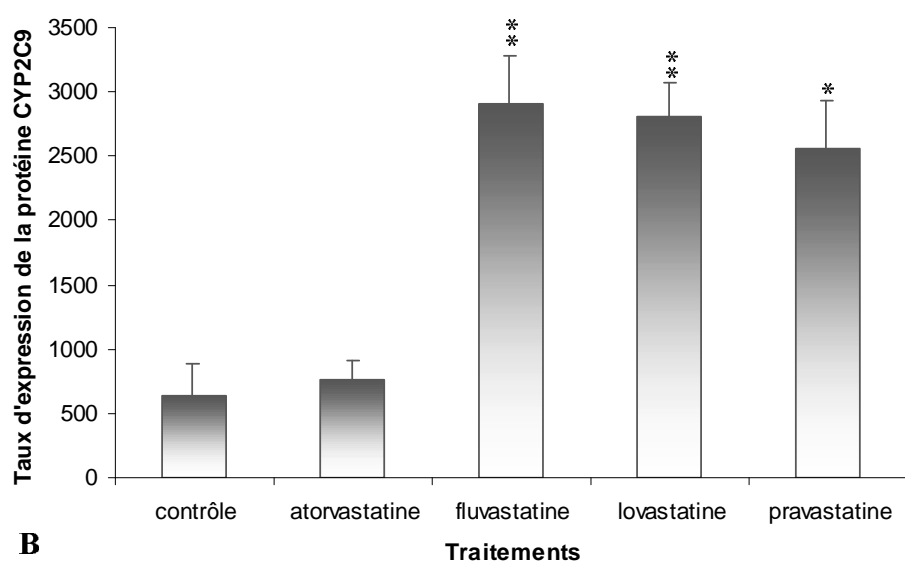
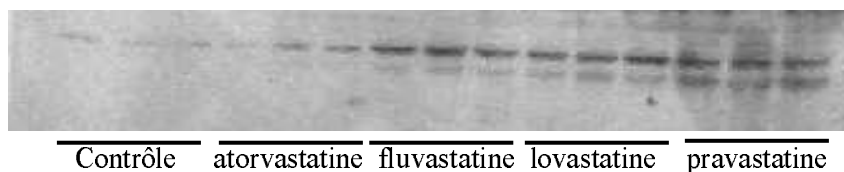
Le cytochrome P450 2C9 étant l'enzyme de la famille 2C la plus importante dans la régulation du tonus vasculaire (Daikh *et al.*, 1994 ; Fisslthaler *et al.*, 1999 ; Fleming *et al.*, 1999 ; Fisslthaler *et al.*, 2003), nous avons étudié l'effet des statines sur l'expression de la protéine 2C9. Pour cela, nous avons traité les cellules ECV304 et HepG2 avec les 4 statines à une concentration de 0,1  $\mu\text{M}$  pendant 96 heures. Les résultats sont présentés sur la figure 48.







**A**



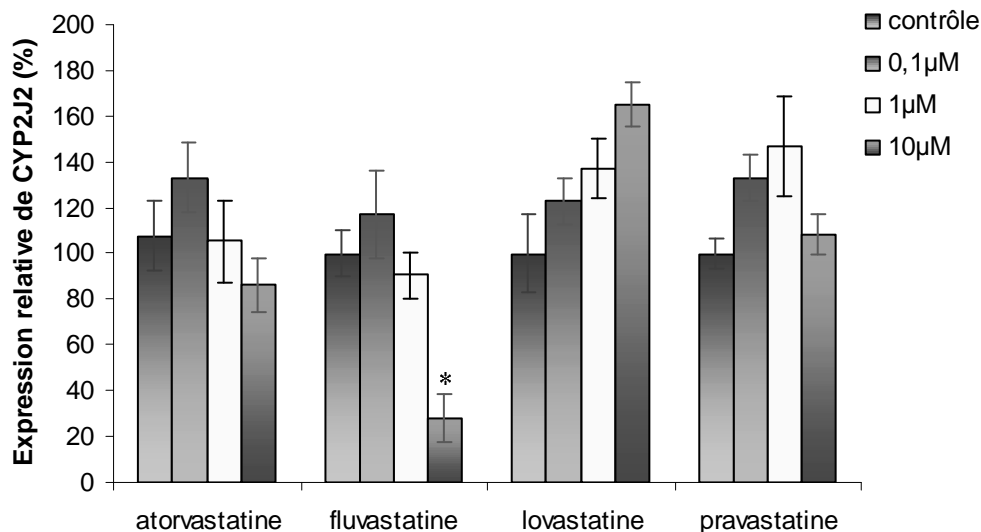
**B**

**Figure 48** : Expression de la protéine CYP2C9 dans les cellules HepG2 (A) et ECV304 (B) après 96 heures de traitement par 4 statines à la concentration de 1  $\mu$ M. (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

De façon générale, ces résultats montrent que, les statines ont les mêmes effets sur les expression de l'ARNm et de la protéine de CYP2C9. En effet, excepté pour la pravastatine qui augmente l'expression de le protéine de CYP2C9 dans les cellules ECV304, les résultats sont similaires entre les ARNm et la protéine.

### 3.2. Le cytochrome P450 2J2.

Le cytochrome P450 2J2 est un des principaux cytochromes impliqués dans le tonus vasculaire par l'intermédiaire de la production de métabolites de l'acide arachidonique, les EETs (Yang *et al.*, 2001). Nous avons étudié l'influence de 4 statines sur l'expression de ce cytochrome P450, les résultats sont présentés sur la figure 49.

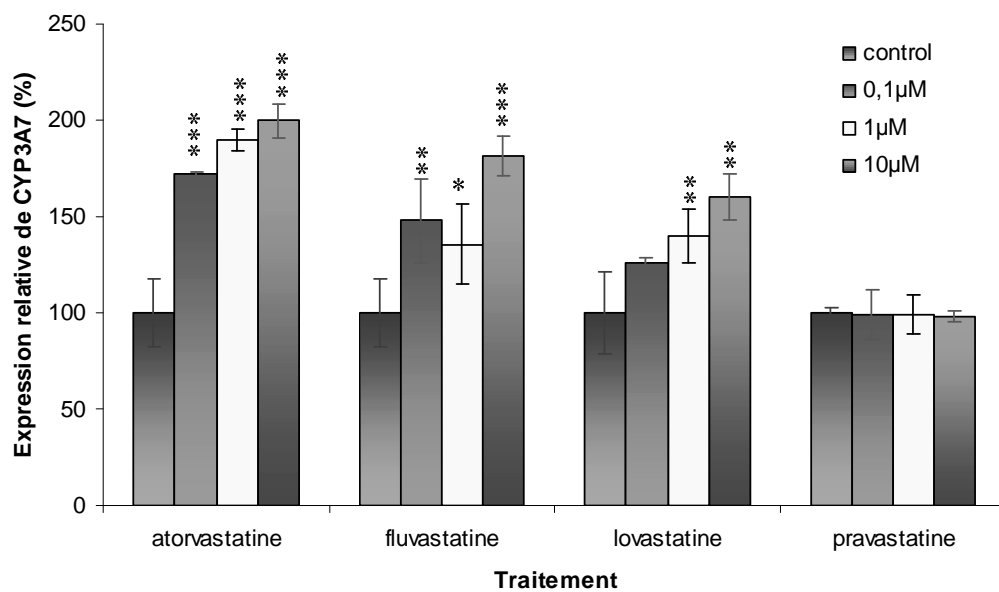


**Figure 49 :** Effet de 4 statines (atorvastatine, fluvastatine, lovastatine et pravastatine) sur l'expression du CYP2J2 dans les cellules ECV304 après 72 heures de traitement. Les cellules « contrôle » sont des cellules non traitées. (\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

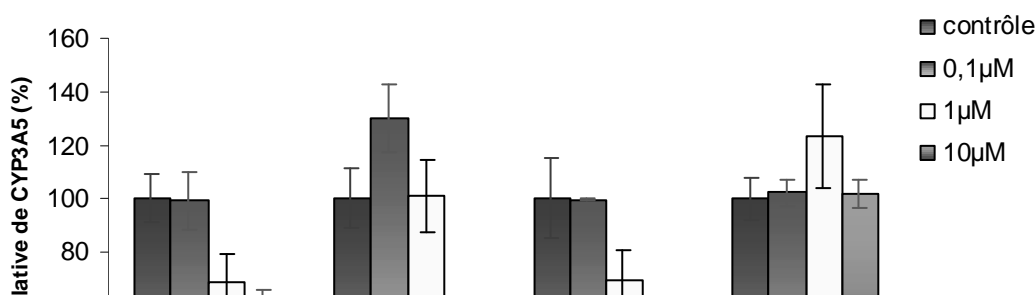
L'atorvastatine et la fluvastatine diminuent l'expression du CYP2J2, cette diminution est plus marquée à 10 µM et d'autant plus pour la fluvastatine, en effet, la diminution du taux d'expression est d'environ 70%. La pravastatine augmente faiblement l'expression à 0,1 et 1 µM, d'environ 1,5 fois, la lovastatine quant à elle augmente le taux d'expression de ce cytochrome de façon dose-dépendante, avec un maximum de 1,6 fois à la concentration la plus forte.

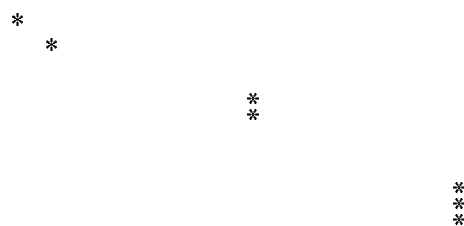
### 3.3. Les cytochromes P450 de la famille 3A.

Les cytochromes P450 de la famille 3A sont les plus exprimés dans le foie humain. L'isoforme majoritaire dans le foie est le CYP3A4. Dans les cellules endothéliales, c'est le CYP3A5 qui est le plus souvent évoqué. Le rôle du cytochrome 3A5 dans le tonus vasculaire est moins décrit que celui des cytochromes des familles 2C et 2J. Toutefois, il est impliqué dans la production d'une molécule vasodilatatrice : le NO (Minamiyama *et al.*, 1999) et plus récemment, il a été décrit que les cytochromes de la famille 3A sont également impliqués dans la production des EETs (Ayajiki *et al.*, 2003). Dans cette partie, nous avons étudié d'une part le CYP3A7 dans les cellules HepG2 car c'est l'isoforme équivalente du CYP3A4 dans cette lignée cellulaire et d'autre part, nous avons étudié le CYP3A5 dans les cellules endothéliales ECV304. Les résultats sont présentés sur les figures 50 et 51.



**Figure 50 :** Effet de 4 statines (atorvastatine, fluvastatine, lovastatine et pravastatine) sur l'expression du CYP3A7 dans les cellules HepG2 après 72 heures de traitement. Trois concentrations différentes ont été utilisées : 0,1 μM, 1 μM et 10 μM. Les cellules « contrôle » sont des cellules non traitées. (\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ ).





**Figure 51** : Effet de 4 statines (atorvastatine, fluvastatine, lovastatine et pravastatine) sur l'expression du CYP3A5 dans les cellules ECV304 après 72 heures de traitement. Trois concentrations différentes ont été utilisées : 0,1  $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$  et 10 $\mu\text{M}$ . Les cellules « contrôle » sont des cellules non traitées. (\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

Ces résultats montrent que l'effet des statines n'est pas identique pour le CYP3A7 et le CYP3A5. En effet, l'atorvastatine, la fluvastatine et la lovastatine induisent le CYP3A7 dans les cellules HepG2 de façon dose-dépendante. Les taux d'augmentation pour la concentration de 10  $\mu\text{M}$  sont de 2, 1,8 et 1,7 pour l'atorvastatine, la fluvastatine et la lovastatine respectivement dans les cellules HepG2. Les expressions des ARNm de CYP3A7 et CYP3A5 ne sont pas influencés par la pravastatine. Dans les cellules ECV304, l'atorvastatine, la fluvastatine et la lovastatine diminuent de l'expression de l'ARNm de CYP3A5. Les diminutions les plus fortes sont obtenues pour la concentration de 1  $\mu\text{M}$ . Les diminutions observées sont de 2 et 2,5 fois pour l'atorvastatine et la fluvastatine respectivement, à cette concentration, la lovastatine produit une diminution totale de l'ARNm de CYP3A5.

*En résumé, les variations les plus importantes sont observées (1) pour le CYP2C9 avec l'atorvastatine dans les cellules HepG2 et la lovastatine dans les cellules ECV304, (2) pour le CYP2C8 avec la lovastatine dans les cellules HepG2 et ECV304 et avec l'atorvastatine dans les cellules ECV304, (3) pour le CYP2J2 avec la fluvastatine dans les cellules ECV304, (4) pour le avec l'atorvastatine dans les cellules HepG2, pour le CYP3A5 avec l'atorvastatine, la fluvastatine et la lovastatine dans les cellules ECV304. L'atorvastatine est donc la statine qui présente le plus d'effet vis-à-vis des différents cytochromes P450 étudiés. La pravastatine quant à elle n'a aucun effet vis-à-vis de tous les gènes étudiés.*

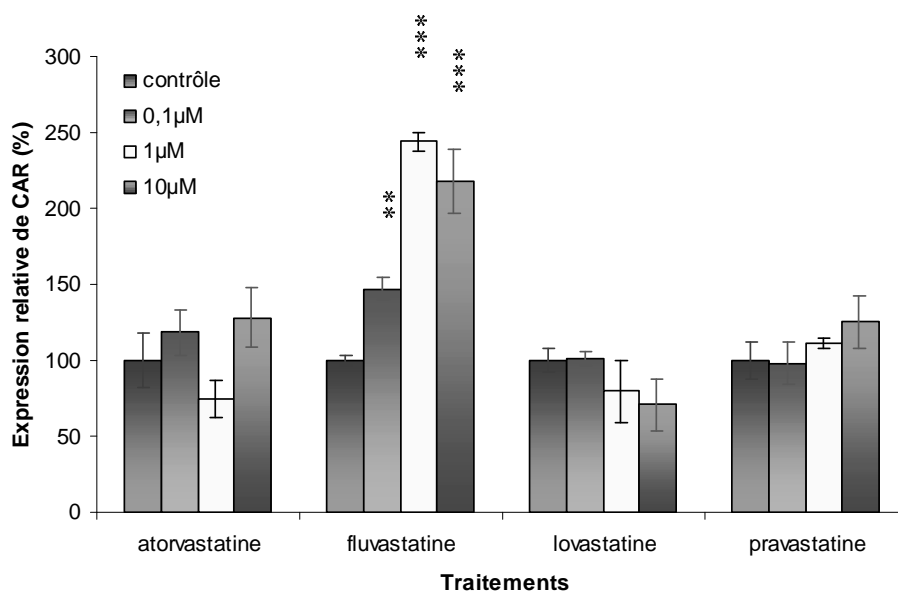
#### 4. Effet des statines sur les récepteurs nucléaires.

La régulation des cytochromes P450 implique différents récepteurs nucléaires notamment CAR, GR et PXR. Dans cette troisième partie, nous avons étudié l'effet des statines sur l'expression des récepteurs nucléaires : le récepteur CAR (*Constitutive androstane receptor*), le récepteur PXR (*Pregnane X Receptor*) et le récepteur aux glucocorticoïdes (*Glucocorticoïde Receptor*) dans les deux lignées cellulaires ECV304 et HepG2.

#### 4.1. Le récepteur CAR.

Le récepteur CAR est impliqué dans les inductions par le phénobarbital. Il est impliqué au moins en partie dans les régulations des cytochromes P450 des familles 2C et 3A. Le récepteur CAR est exprimé dans les cellules endothéliales et dans les cellules HepG2.

Nous avons montré que les cytochromes des familles 2C et 3A sont régulés par plusieurs statines, nous avons donc recherché si l'expression du récepteur CAR pouvait également être influencée par les statines. Les résultats sont présentés sur la figure 52.

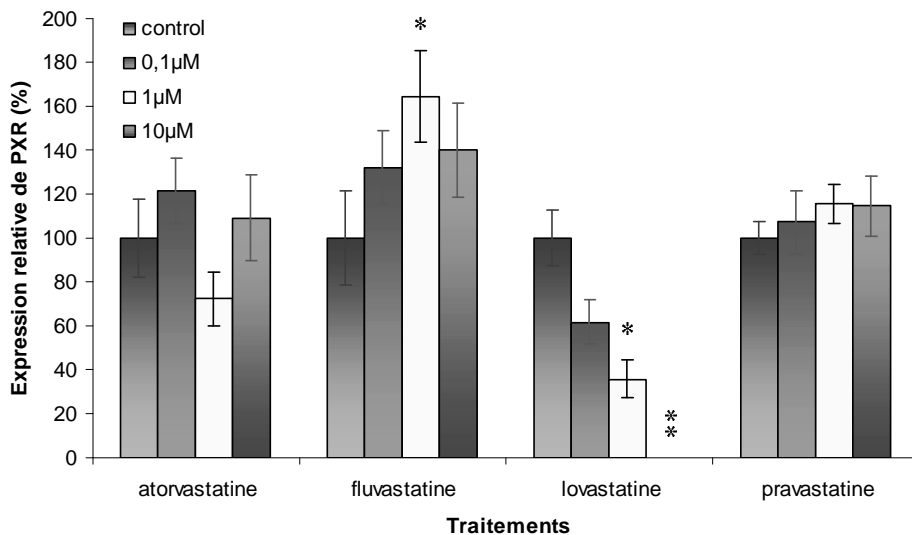


**Figure 52 :** Effet de 4 statines (atorvastatine, fluvastatine, lovastatine et pravastatine) sur l'expression du récepteur CAR dans les cellules HepG2 après 48 heures de traitement. Les cellules contrôle sont des cellules non traitées. (\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

Nous pouvons constater que seule la fluvastatine produit un effet significatif sur l'expression de l'ARNm du récepteur CAR. Nous observons une augmentation d'environ 2,5 fois aux concentrations 1 et 10 μM.

#### 4.2. Le récepteur PXR.

Le récepteur PXR intervient principalement dans la régulation des cytochromes P450 de la famille 3A mais récemment, il a été démontré qu'il intervenait également dans la régulation des cytochromes P450 de la famille 2C et plus particulièrement le CYP2C9. Comme les cytochromes de la famille 3A et ceux de la famille 2C sont influencés par les différentes statines que nous avons utilisées, nous avons étudié l'influence de ces molécules sur l'expression de l'ARNm du récepteur PXR dans les cellules HepG2 uniquement puisque nous avons démontré précédemment que les cellules endothéliales ECV304 étaient dépourvues de ce récepteur. Les résultats sont présentés sur la figure 53.

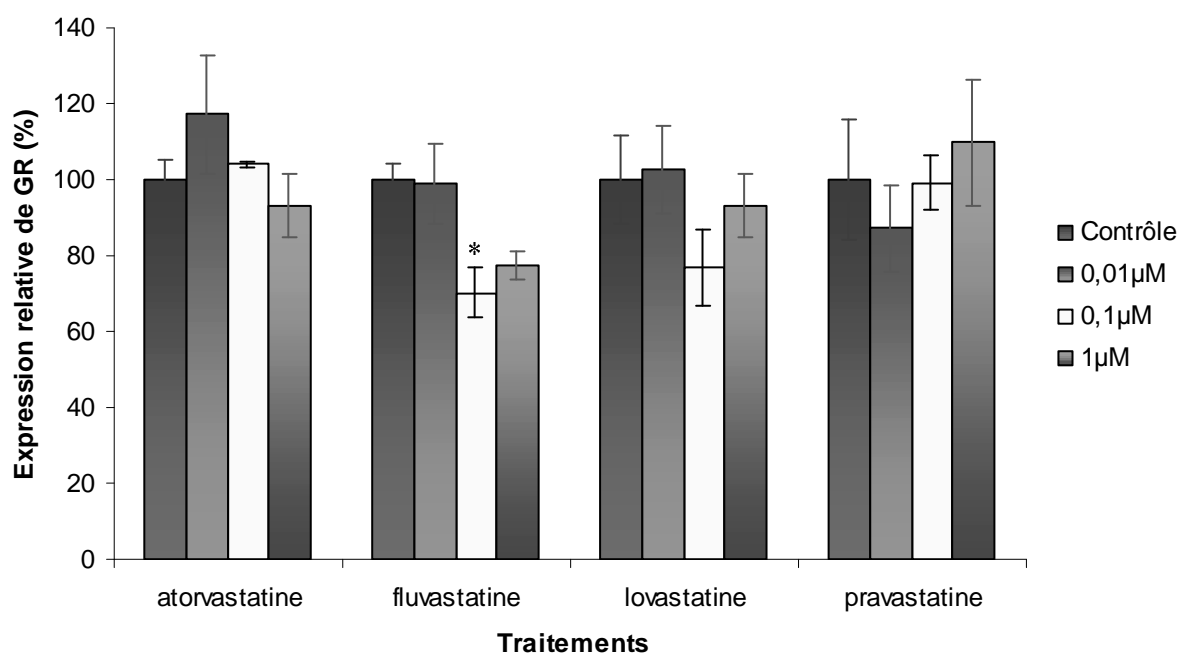


**Figure 53** : Effet de 4 statines (atorvastatine, fluvastatine, lovastatine et pravastatine) sur l'expression du récepteur PXR dans les cellules HepG2 après 48 heures de traitement. Les cellules contrôle sont des cellules non traitées. (\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

L'atorvastatine et la pravastatine n'ont pas d'effet significatif sur l'expression de ce récepteur. La fluvastatine à la concentration de 1  $\mu\text{M}$  augmente l'expression de l'ARNm du récepteur PXR d'environ 1,6 fois. La lovastatine diminue fortement l'expression du récepteur PXR de façon dose-dépendante, on constate qu'à la plus forte concentration (10  $\mu\text{M}$ ), il n'y a plus aucun ARNm de PXR détecté.

### 4.3. Le récepteur GR.

Le récepteur GR est impliqué dans la régulation des cytochromes P450 des familles 2C et 3A. Ce récepteur GR étant exprimé dans les cellules ECV304, nous avons étudié l'influence des 4 statines sur l'expression de ce récepteur dans la lignée ECV304. Les résultats sont présentés sur la figure 54.



**Figure 54 :** Effet de 4 statines (atorvastatine, fluvastatine, lovastatine et pravastatine) sur l'expression du récepteur GR dans les cellules ECV304 après 48 heures de traitement. Les cellules contrôle sont des cellules non traitées.

L'atorvastatine, la lovastatine et la pravastatine n'ont pas d'effet significatif sur l'expression de l'ARNm du récepteur GR. Seule la fluvastatine présente une diminution d'environ 1,2 fois pour les concentrations 0,1 et 1 µM.

*En résumé, nous avons observé que la fluvastatine augmente l'expression des ARNm de CAR et de PXR. Le récepteur GR n'est que faiblement influencé par la fluvastatine*

## 5. Discussion.

### 1. Viabilité cellulaire.

Tout d'abord, nous avons constaté que les plus fortes concentrations de statines utilisées (10  $\mu$ M) diminuent fortement la viabilité des cellules endothéliales ECV304. Cet effet est dose-dépendant, il est plus marqué dans les cellules endothéliales que dans les cellules HepG2. Ces résultats coïncident avec les précédentes études réalisées sur d'autres statines. En effet, les statines lipophiles telles que l'atorvastatine, la fluvastatine et la lovastatine provoquent l'apoptose des cellules musculaires lisses vasculaires. La fluvastatine induit également l'apoptose dans les cellules endothéliales Ea.hy926 (Newton *et al.*, 2003). En revanche, la pravastatine, statine hydrophile, n'a pas d'influence sur la viabilité des cellules musculaires lisses (Guijarro *et al.*, 1999). Certaines statines ont également des effets sur la prolifération des myocytes artériels en culture (Bellosta *et al.*, 2000) et des cellules endothéliales (Negre-Aminou *et al.*, 1997 ; Vincent *et al.*, 2002).

## ***2. Effet des statines selon la lignée cellulaire.***

Les inhibiteurs de l'HMGCoA réductase influencent l'expression des cytochromes P450 2C, 2J2 et 3A5. Nous avons constaté d'une part, que l'effet des statines sur les cytochromes P450 n'est pas identique selon la lignée cellulaire étudiée et d'autre part que l'effet sur les cytochromes P450 n'est pas similaire d'une statine à l'autre. En effet, dans la lignée HepG2, toutes les statines, excepté la pravastatine, induisent l'expression de CYP3A et CYP2C tandis que dans les cellules ECV304, l'expression des cytochromes P450 étudiés est réprimée par l'atorvastatine et induite par la lovastatine alors que la fluvastatine n'a pas d'effet significatif. Comme observé dans les cellules HepG2, la pravastatine n'a aucun effet.

### ***2.1. Cellules HepG2.***

Dans les cellules HepG2, l'atorvastatine, la fluvastatine et la lovastatine induisent le taux d'ARNm des CYP3A7, CYP2C8 et CYP2C9. L'expression de CYP2C total qui représente tous les cytochromes P450 de la famille 2C présents dans les cellules HepG2 ne varie pas de façon significative après ces traitements. Ceci peut s'expliquer par le fait que tous les cytochromes P450 de la famille 2C ne répondent pas de la même façon aux traitements par les statines. Comme attendu, l'effet de ces molécules sur le taux de la protéine de CYP2C9 après 96 heures de traitement est identique à celui observé pour l'ARNm.

Le CYP3A7 est induit d'environ 2 fois par l'atorvastatine, la fluvastatine et la lovastatine pour la concentration 10  $\mu$ M dans les cellules HepG2. De précédentes études



réalisées sur les cytochromes P450 de la famille 3A chez l'homme mais également dans d'autres espèces montrent un effet similaire des statines. En effet, la lovastatine, la fluvastatine et la simvastatine induisent le taux de CYP3A1/2 dans les hépatocytes de rat (Kocarek *et al.*, 1995 ; Kocarek et Reddy, 1996). La lovastatine, la simvastatine, la fluvastatine et l'atorvastatine induisent l'expression de CYP3A dans les hépatocytes humains (Schuetz *et al.*, 1993 ; Kocarek *et al.*, 2002). Nous n'avons observé aucun effet de la pravastatine sur ces différentes enzymes. Ceci est en accord avec les études déjà réalisées sur le CYP3A1/2 dans les hépatocytes de rat (Kocarek et Reddy, 1996).

## ***2.2. Cellules endothéliales.***

Dans les cellules endothéliales, nous avons montré que les CYP2C étaient régulés par différentes statines notamment l'atorvastatine et la lovastatine. Toutefois, elles n'ont pas toutes le même effet sur ces cytochromes P450. L'atorvastatine diminue l'expression des CYP2C alors que la lovastatine augmente leur expression. L'étude de l'expression de la protéine CYP2C9 montre que les statines influencent de la même façon les taux d'ARNm et de la protéine. L'expression de l'ARNm de CYP2J2 est influencée par les 4 statines (atorvastatine, fluvastatine, lovastatine et pravastatine), l'atorvastatine et la fluvastatine diminuent l'expression de CYP2J2 alors que la lovastatine et la pravastatine augmentent l'expression de cette enzyme. L'expression de l'ARNm du CYP3A5 quant à elle est diminuée par l'atorvastatine, la fluvastatine et la lovastatine, la pravastatine n'a pas d'effet. L'étude des protéines de CYP2C8, CYP2J2 et CYP3A5 n'a pas été réalisée car aucun anticorps contre ces cytochromes P450 n'était disponible au moment de la rédaction de ce travail.

Ces données nous permettent donc de déduire que les statines n'ont pas le même effet suivant le cytochrome P450 étudié. Cet effet semble dépendre de la localisation cellulaire. En effet, le CYP3A5 régulé de la même façon que le CYP3A7 (Waxman, 1999) a une expression diminuée par l'atorvastatine, la fluvastatine et la lovastatine dans les cellules endothéliales alors que le CYP3A7 a une expression augmentée dans les cellules HepG2. De la même façon, dans les cellules HepG2, l'expression des CYP2C est augmentée par l'atorvastatine, la fluvastatine et la lovastatine alors que dans les cellules ECV304, l'expression des CYP2C est diminuée par l'atorvastatine et augmentée par la lovastatine, la fluvastatine augmente de façon non significative l'expression de CYP2C9. De façon générale,

ces données sont pas en accord avec les données de la littérature puisque Fisslthaler *et al.*, (2003) ont démontré que la fluvastatine et la cêrivastatine induisent l'expression de CYP2C9 dans les cellules endothéliales d'artères coronaires de porc.

Les résultats obtenus avec la pravastatine sont aussi en accord avec la littérature puisque les études concernant la pravastatine montrent que cette molécule n'influence pas l'expression de CYP3A (Kocarek et Reddy, 1996). De plus, dans les études de prolifération cellulaire, il a également été démontré que la pravastatine ne présente aucun effet (Guijarro *et al.*, 1999). Ces différences seraient liées aux propriétés hydrophiles de la pravastatine (Corsini *et al.*, 1999 ; Laws *et al.*, 2004).

### 3. Récepteurs nucléaires.

Dans la première partie de cette étude, nous avons observé que les récepteurs CAR et GR étaient exprimés dans les cellules HepG2 et les cellules endothéliales alors que le récepteur nucléaire PXR n'était exprimé que dans les cellules HepG2. La tableau 7 résume les résultats obtenus.

	HepG2	HSaVEC	ECV304	CMLV
<b>CAR</b>	+	+	+	+
<b>GR</b>	+	-	+	+
<b>PXR</b>	+	-	-	-

**Tableau 7 :** Expression des différents récepteurs nucléaires CAR, GR et PXR dans les cellules endothéliales HSaVEC, ECV304, dans les cellules d'hépatoblastome humain HepG2 et dans les cellules musculaires lisse vasculaires (CMLV).

Dans cette partie du travail, nous avons observé que seule la fluvastatine augmente l'expression des récepteurs CAR et PXR et diminue l'expression du récepteur GR. Sur le tableau 8 sont résumés les résultats obtenus pour les différents gènes (CYP2C8, CYP2C9,

CYP3A, CAR, GR et PXR) après traitements par les différentes statines dans les cellules HepG2 et ECV304.

		HepG2	ECV304
CYP2C8	Atrovastatine	0	-
	Fluvastatine	+	+
	Lovastatine	0	0
	Pravastatine	0	0
CYP2C9	Atrovastatine	++	-
	Fluvastatine	+	++
	Lovastatine	+	+
	Pravastatine	0	0
CYP3A	Atrovastatine	+	-
	Fluvastatine	+	-
	Lovastatine	+	-
	Pravastatine	0	0
CAR	Atrovastatine	0	
	Fluvastatine	+	
	Lovastatine	0	
	Pravastatine	0	0
GR	Atrovastatine		0
	Fluvastatine		-
	Lovastatine		0
	Pravastatine	0	0

PXR	Atrovastatine	0	ND
	Fluvastatine	+	ND
	Lovastatine	-	ND
	Pravastatine	0	ND

**Tableau 8** : résumé des résultats obtenus pour les différents gènes étudiés après traitement par des statines dans les lignées cellulaires HepG2 et ECV304.

Ces résultats montrent que le CYP2C9 est induit par les statines dans les cellules HepG2 et ECV304, en revanche, le CYP3A n'est induit que dans la lignée cellulaire HepG2. Comme précisé précédemment, la pravastatine n'a aucun effet sur les différents gènes testés quelle que soit la lignée cellulaire. La différence observée entre les CYP2C9 et CYP3A peut s'expliquer par la présence ou l'absence des récepteurs nucléaires. Comme nous l'avons décrit dans la première partie de ce travail, les trois récepteurs testés (CAR, GR et PXR) sont présents dans les cellules HepG2 alors que seuls les récepteurs GR et CAR sont détectés dans les cellules ECV304. Le CYP2C9 est régulé par le récepteur CAR (Gerbai-Chaloin *et al.*, 2002) présent dans les deux types cellulaires HepG2 et ECV304, ce qui explique l'augmentation de son expression dans les deux types cellulaires. En revanche, les cytochromes P450 de la famille 3A sont régulés principalement par le récepteur PXR (Moore *et al.*, 2000), présent dans la lignée HepG2 mais absent dans la lignée ECV304, ce qui explique que le CYP3A5 ne soit pas induit dans la lignée ECV304.

La lovastatine active le récepteur PXR (Lehmann *et al.*, 1998). Compte tenu de la similitude de structure des différentes statines, nous pouvons supposer que l'atorvastatine et la fluvastatine induisent l'expression de CYP3A7 dans les cellules HepG2 par l'intermédiaire de l'activation de PXR. Nous pouvons également supposer un mécanisme similaire pour l'induction de CYP2C9 par le récepteur nucléaire CAR. Seule la fluvastatine présente un effet significatif vis-à-vis de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires CAR, PXR et GR, il est donc possible que la fluvastatine induise les CYP2C9 et CYP3A de façon classique par activation des récepteurs nucléaires mais également par induction de l'expression de ces récepteurs.

Il semble donc que les mécanismes de régulation de l'expression des cytochromes P450 par les statines soient complexes et fassent intervenir non seulement une activation mais également avec certaines statines (fluvastatine) une induction des récepteurs nucléaires. Cette cascade est connue à propos de CAR qui est induit par l'activation du récepteur GR (Pascussi *et al.*, 2003).

#### ***4. Différences entre cellules.***

Les différences observées entre les lignées cellulaires peuvent s'expliquer par l'expression des différents récepteurs nucléaires. Ainsi, les récepteurs CAR et GR sont exprimés dans les deux types cellulaires HepG2 et ECV304 alors que le récepteur PXR n'est exprimé que dans la lignée cellulaire HepG2. Or le récepteur GR contrôle l'expression des deux récepteurs PXR (Pascussi *et al.*, 2000) et CAR (Pascussi *et al.*, 2003). Nous pouvons alors comprendre que la réponse des différents gènes étudiés vis-à-vis des statines ne soit pas la même dans les deux lignées cellulaires. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'effet des statines soit médié par GR puis par CAR et PXR dans la lignée HepG2 mais ne s'effectue que via CAR dans la lignée ECV304. Concernant les cytochromes P450 de la famille 2C, nous n'avons pas observé de différence très significative entre les deux lignées étudiées or la régulation de l'expression des cytochromes P450 de la famille 2C se fait principalement par les deux récepteurs nucléaires CAR et GR (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2002) qui sont présents dans HepG2 et ECV304.

#### ***5. Conséquences « physiologiques » à l'échelle cellulaire.***

Le CYP2C9 métabolise l'acide arachidonique en métabolites vasodilatateurs les EETs (Hoebel *et al.*, 1998 ; Fisslthaler *et al.*, 1999). L'augmentation de l'expression de CYP2C9 augmente la production d'EETs dans le foie ou par les cellules endothéliales. L'augmentation de la production d'EETs favorise la vasodilatation. La fluvastatine et la lovastatine possèderaient donc cette propriété vasodilatatrice. De la même façon, CYP3A métabolise l'acide arachidonique en métabolites EETs vasodilatateurs mais produit également du NO à partir de composés nitrés tels que le dinitrate d'isosorbide (Minamiyama *et al.*, 1999). Ainsi, une augmentation de l'expression de CYP3A pourrait augmenter la production de métabolites vasoactifs tels que les EETs et le NO. Les statines jouent un rôle dans le tonus vasculaire par l'intermédiaire d'une augmentation de la production de NO (Rueckschloss *et al.*, 2001) ainsi

que par la production de prostaglandine I<sub>2</sub> vasodilatatrice (Levine, 2003). En plus, les métabolites produits par les CYP2C et peut être CYP3A pourrait contribuer à cet effet vasodilatateur.

En conclusion, dans les cellules endothéliales, les statines, ont un effet sur l'expression de CYP2C9 et CYP3A. Nous avons montré que les cytochromes P450 CYP2J2 et CYP3A5 étaient ceux qui étaient le plus influencés par la pathologie variqueuse et les CYP2C sont les cytochromes les plus décrits comme intervenant dans la régulation du tonus vasculaire (Fisslthaler *et al.*, 1999 ; Fisslthaler *et al.*, 2001).

La fluvastatine et la lovastatine augmentent l'expression des cytochromes P450 2C et 2J2, producteurs de molécules vasodilatatrices. De plus, la lovastatine augmente la libération de l'acide arachidonique (Levine, 2003). Le rôle des statines sur la production de molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices viendrait conforter un effet vasodilatateur d'origine endothéliale (Bellosta *et al.*, 2000 ; Corsini *et al.*, 1999 ; Laws *et al.*, 2004). Les effets bénéfiques sur l'endothélium seraient médiés non seulement par l'action sur l'endothéline et sur la NO synthase mais également sur quelques cytochromes P450.

Toutefois ces conclusions hypothétiques nécessitent des études de la production de métabolites vaso-actifs par les cellules en présence des statines les plus actives.

### **III. ETUDES DE POLYMORPHISME.**

#### **A. Polymorphismes de CYP2J2, CYP2C19 et hypertension.**

A l'heure actuelle, seuls le polymorphisme CYP2C8\*3, les polymorphismes CYP2J2\*2, CYP2J2\*3, CYP2J2\*4 et CYP2J2\*6 et un polymorphisme de CYP4A11 sont

connus comme étant responsables d'une modification du métabolisme de l'acide arachidonique. Compte tenu de l'importance des métabolites de l'acide arachidonique dans la régulation du tonus vasculaire, nous pouvons supposer que la présence de certains polymorphismes de cytochromes P450 soient impliqués partiellement dans l'apparition de la pathologie cardiaque ou vasculaire. C'est pourquoi dans la troisième partie de notre étude, nous nous sommes intéressés aux polymorphismes des cytochromes de la famille 2C et du cytochrome 2J2.

L'étude a été réalisée chez 273 hommes et 272 femmes.

## 1. Polymorphisme de CYP2C19.

Le cytochrome P450 2C19 est le cytochrome P450 de la famille 2C qui présente le plus grand nombre de variants. Le polymorphisme le plus fréquent dans la population française (13%) (Ibeanu *et al.*, 1998) est le polymorphisme 2C19\*2 qui représente 4 changements nucléotidiques appelés également SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) : 99C>T, 681G>A, 990C>T, 991A>G constituant un haplotype. Nous avons choisi de rechercher les SNPs 681G>A et 990C>T car ils suffisent à caractériser le polymorphisme CYP2C19\*2. De plus, le changement nucléotidique 681G>A présent dans l'exon 5 est celui qui est responsable de l'inactivité de l'enzyme (Ibeanu *et al.*, 1998).

## 2. Etude de la fréquence allélique des SNP 681 et 990.

Nous avons participé à une étude de la fréquence des deux mutations 681G>A et 990C>T dans la Cohorte Stanislas chez 359 personnes. Les résultats sont présentés dans le tableau 9.

	Hommes	Femmes	total
CYP2C19-681			
GG	175 (64,1%)	198 (72,8%)	373 (68,44%)
GA	86 (31,5%)	65 (23,9%)	151 (27,70%)
AA	12 (4,4%)	9 (3,3%)	21 (3,85%)
Fréquences alléliques			
A	20,14%	15,25%	17,70%
G	79,85%	84,74%	82,29%
CYP2C19-990			

CC	176 (71,3%)	194 (64,5%)	370 (67,89%)
CT	84 (25,0%)	68 (30,8%)	152 (27,88%)
TT	13 (3,7%)	10 (4,7%)	23 (4,22%)
Fréquences alléliques			
T	20,14%	16,17%	18,16%
C	79,85 %	83,82%	81,83%

**Tableau 9 :** Fréquence allélique et distribution génotypique du polymorphisme CYP2C19\*2 en fonction du genre dans la population supposée saine de la cohorte Stanislas.

Dans cette population, les changements nucléotidiques 681G>A ou 990C>T sont présents avec une fréquence de 18%.

### 3. Polymorphisme et pression sanguine.

Puisque CYP2C19 métabolise l'acide arachidonique en acides epoxyeicosatriénoïques, nous avons fait l'hypothèse qu'un polymorphisme de CYP2C19 pouvait influencer le métabolisme de cette substance endogène ce qui pourrait avoir pour conséquence une modification de la production de métabolites vaso-actifs tels que les EETs. Pour cela, nous avons étudié le lien possible entre la présence des mutations aux positions 681 et 990 et la pression sanguine. Les valeurs de pressions sanguines diastoliques (DBP) et systoliques (SBP) sont étudiées en fonction de la présence de l'allèle muté ou pas. Les résultats sont présentés dans le tableau 8 pour le changement nucléotidique 681G>A (les mêmes résultats ont été obtenus à propos de la mutation 990C>T).

Les valeurs de pression sanguines dans les différents groupes de sujets sont présentés dans le tableau 10.

SNP 681G>A	sexe (n)	SBP (mm Hg)	DBP (mm Hg)
GG	hommes (113)	125,03 ± 11,31	77,69 ± 7,87
	femmes (129)	115,93 ± 9,36	65,93 ± 8,85
GA	hommes (56)	126,08 ± 11,34	75,76 ± 7,8
	femmes (46)	121,87 ± 4,89	72,69 ± 10,17



AA	hommes (9)	127,02 ± 12,85	76,66 ± 10,50
	femmes (6)	119,87 ± 4,02	70,54 ± 10,07

**Tableau 10** : Valeurs moyennes des pressions sanguines systolique (SBP) et diastolique (DBP) en fonction du sexe et du génotype pour le changement nucléotidique 681G>A. Les valeurs plus ou moins représentent les bornes de l'intervalle dans lequel se trouvent les patients étudiés.

La pression sanguine est considérée comme :

- basse quand la pression systolique est inférieure à 120 mm de mercure (120mmHg) et la pression diastolique inférieure à 80 mmHg,
- normale quand la pression systolique est inférieure à 130 mmHg et la pression diastolique inférieure à 85 mmHg,
- haute quand la pression systolique est supérieure à 140 mmHg et la pression diastolique supérieure à 90 mmHg (valeurs de l'Organisation Mondiale de la Santé).

*L'étude menée par régression multiple montre, pour les changements nucléotidiques étudiés, 681G>A ou 990C>T, qu'il n'y a pas de variation significative des pressions sanguines diastolique ou systolique selon la présence de l'allèle muté ou pas ni chez les hommes ni chez les femmes.*

*CYP2C19 qui métabolise l'acide arachidonique en acide epoxyeicosatrienoïque et qui est exclusivement hépatique n'est donc pas un gène candidat dans la régulation de la tension artérielle.*

## 4. Discussion.

### 1. Fréquence Allélique.

La fréquence allélique observée pour les allèles 681G>A ou 990C>T est de 18 %. Ce résultat est en accord avec les autres observations en Europe : une autre population française présente une fréquence allélique de 13% (Ibeanu *et al.*, 1998), une population allemande a une fréquence allélique de 15% (Brockmöller *et al.*, 1995), dans une population suédoise, le polymorphisme CYP2C19\*2 est présent dans 15% des cas (Yamada *et al.*, 1998), CYP2C19\*2 est présent à 13,3% dans une population danoise (Tamminga *et al.*, 2001), enfin dans la population portugaise, l'allèle muté CYP2C19\*2 est présent dans 15% des cas (Ruas *et al.*, 1997). Nous avons vérifié statistiquement que ces différences ne sont pas significatives. Les sujets homozygotes pour CYP2C19\*2 sont présents à raison de 4%, ce qui est en accord

avec les résultats obtenu par Goldstein (2001), qui rapporte une fréquence de 3-5% de métaboliseurs lents de la méphénytoïne.

## **2. Polymorphisme et pression.**

Malgré l'importance potentielle de CYP2C19 dans le métabolisme de l'acide arachidonique, nous n'avons pas observé de lien entre la présence d'une forme mutée (CYP2C19\*2) du gène et la pression artérielle systolique et diastolique. La fréquence allélique de 18% de la mutation a imposé de comparer les homozygotes fréquents GG à l'ensemble des hétérozygotes GA (28%) et des homozygotes AA (4%). Il se peut que la taille de la population et la fréquence des homozygotes mutés soient trop faibles pour que des petites variations tensionnelles soient significatives.

CYP2C19 est exprimé essentiellement dans le foie, il est seulement à la limite de détection dans les parois vasculaires (Thum et Borlak, 2004). Les CYP2C8 et CYP2C9 sont exprimés dans les cellules endothéliales vasculaires et peuvent ainsi être de meilleurs candidats à un rôle dans les pathologies cardiovasculaires. En témoigne l'étude récemment publiée par Yasar *et al.*, (2003) qui suggère un rôle des mutations CYP2C8\*3, CYP2C9\*2 et CYP2C9\*3 dans le risque d'infarctus du myocarde. Un autre candidat possible, exprimé dans les parois vasculaires est CYP3A5. En effet, Givens *et al.*, (2003) ont montré que la pression sanguine systolique était diminuée chez les individus porteurs de l'allèle muté CYP3A5\*3. Enfin, une étude non encore publiée, mais rapportée dans un congrès (Prague, 2003) par JH. Capdevila, désigne un variant de CYP4A11 (F434S) comme plus fréquent chez les hypertendus, avec des différences phénotypiques dans la 20-hydroxylation de l'acide arachidonique.

## **B. Polymorphisme et marqueurs inflammatoires (*Publication n°4*).**

Outre la régulation de la pression sanguine, la composante inflammatoire est importante dans la survenue de maladies cardiovasculaires.

Les principaux marqueurs inflammatoires sont les interleukines telles que l'IL-6 et le *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), le taux de leucocytes et la C-réactive protéine (CRP). Nous avons étudié l'effet du polymorphisme de CYP2C19\*2 sur les taux plasmatiques des marqueurs inflammatoires. Les données concernant les marqueurs inflammatoires n'étaient disponibles que pour une partie de la population étudiée, c'est pourquoi cette étude sera réalisée chez 178 hommes et 181 femmes.

## 1. Etude de la fréquence allélique.

Le groupe d'étude étant plus petit que celui utilisé pour l'étude de la pression sanguine, nous avons de nouveau étudié la fréquence allélique des deux SNP examinés (681G>A et 990C>T). Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

	Hommes	Femmes	total
<b>CYP2C19-681</b>			
GG	113 (63.48%)	129 (71.27%)	242 (67.41%)
GA	56 (31.46%)	46 (25.41%)	102 (28.41%)
AA	9 (5.06%)	6 (3.31%)	15 (4.18%)
<b>Fréquences alléliques</b>			
A	20.8%	16.0%	18.4%
G	79.2%	84.0%	81.6%
<b>CYP2C19-990</b>			
CC	112 (62.92%)	132 (72.93)	244 (67.97%)
CT	58 (32.58%)	44 (24.31%)	102 (28.41%)
TT	8 (4.49%)	5 (2.76%)	13 (3.72%)
<b>Fréquences alléliques</b>			
T	20.8%	14.9%	17.8%
C	79.2%	85.1%	82.2%

**Tableau 11 :** Fréquence allélique et distribution génotypique du polymorphisme CYP2C19\*2 en fonction du genre dans la population supposée saine de la cohorte Stanislas.

Dans cette population, les changements nucléotidiques 681G>A ou 990C>T sont présents avec une fréquence de 18%.

## 2. Interleukine-6.

L'interleukine-6 est une cytokine présente dans certaines pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose (Ross, 1999). Nous avons étudié l'influence de l'allèle muté CYP2C19\*2 sur les taux plasmatiques d'IL-6. Les résultats sont présentés sur la figure 55 et le tableau 12.

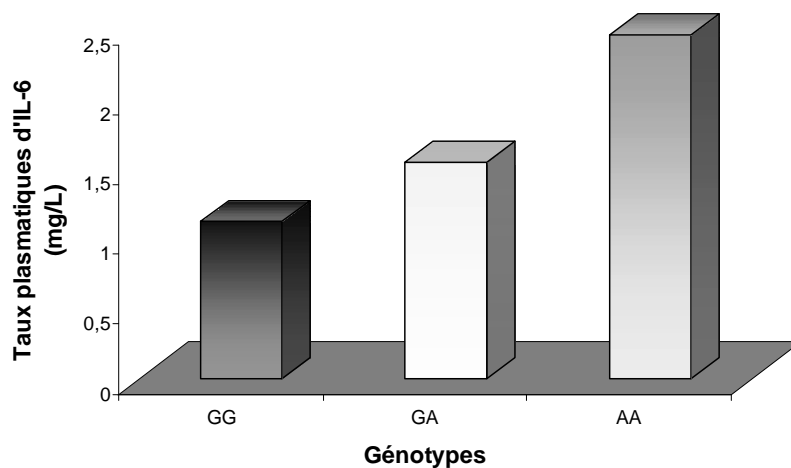


Figure 55 : Influence du polymorphisme CYP2C19\*2 sur le taux plasmatique de l'interleukine-6 dans la population supposée saine de la Cohorte Stanislas.

	Hommes		Femmes	
	$\beta$	p	$\beta$	p
<b>IL-6 (mg/ml)</b>	<b>0,25164</b>	<b>0,0328 (*)</b>	<b>0,28135</b>	<b>0,0088 (**)</b>

Tableau 12 : Analyse par régression multiple de l'association entre les taux plasmatiques d'IL-6 et l'allèle muté CYP2C19\*2.

Ces résultats montrent que la variation des taux d'interleukine-6 en fonction du polymorphisme CYP2C19\*2 est significative chez les hommes et les femmes.

### 3. Autres marqueurs inflammatoires.

La réaction inflammatoire dans les pathologies cardiovasculaires est caractérisée dans la plupart des cas par une modification des taux d'interleukine-6 mais également des taux de TNF- $\alpha$  (Ross, 1999). En plus de ces deux cytokines, la protéine-C-réactive (CRP), est devenue un marqueur de la réaction inflammatoire (Koenig *et al.*, 1999 ; Tracy *et al.*, 1997 ; Ridker *et al.*, 2000). Des variations des taux de leucocytes ont également été observés dans les pathologies cardiovasculaires (Eriksson, 2003). Nous avons donc étudié le lien possible entre les taux plasmatiques de ces marqueurs inflammatoires et la présence de l'allèle muté CYP2C19\*2. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

	*1/ *1	*1 / *2	*2 / *2	*1/ *2 + *2 / *2	P
Génotype	GG n = 242	GA n = 102	AA n = 15	GA + AA n = 117	
TNF- $\alpha$ (ng/L)	0,80 (0,38-1,85)	1,02 (0,50-2,61)	1,56 (0,51-3,59)	1,05 (0,51-2,67)	NS
CRP (mg/L)	0,75 (0,39-1,38)	0,84 (0,42-1,93)	0,84 (0,60-1,80)	0,84 (0,45-1,87)	NS
Leucocytes count (10 <sup>9</sup> /L)	6,4 (5,5-7,4)	6,9 (5,7-8,0)	7,0 (6,1-8,4)	6,9 (5,8-8,0)	0,0036

**Tableau 13** : Concentrations plasmatiques de TNF- $\alpha$ , CRP et des leucocytes en fonction du génotype de CYP2C19 en position 681.

Le tableau suivant présente l'analyse de régression statistique réalisées pour les taux plasmatiques de TNF- $\alpha$ , protéine-C-réactive et de leucocytes en association avec la présence de l'allèle muté CYP2C19\*2. Les études ont été réalisées séparément chez les hommes et chez les femmes.

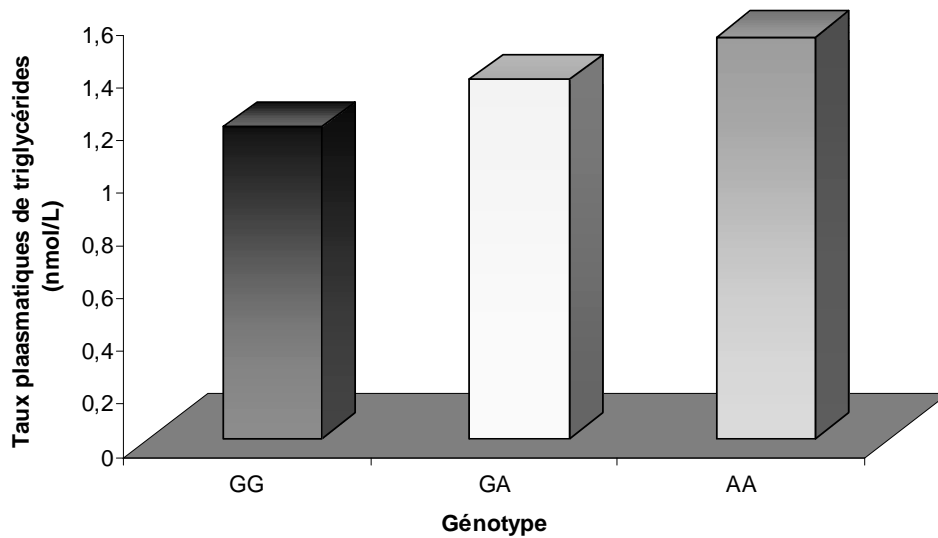
	Hommes n= 178		Femmes n=181	
	$\beta$	p	$\beta$	p
<b>Ln (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	0,36386	0,0556 (-)	0,17240	0,4356 (-)
<b>Ln (Leu)</b>	0,03062	0,3974 (-)	0,13173	0,0002 (***)
<b>Ln (CRP)</b>	-0,16299	0,2984 (-)	0,40800	0,0075 (**)

**Tableau 14** : Analyse de régression des différents marqueurs inflammatoires. Les valeurs sont exprimées en logarithme népérien. (TNF- $\alpha$ , Leu : Leucocytes, CRP : C-Reactive Protein).  $\beta$  représente la valeur moyenne chez les hommes ou femmes pour la variable testée, p est le facteur de significativité statistique : (\*),  $p < 0.05$ , (\*\*),  $p < 0.01$ , (\*\*\*),  $p < 0.001$ .

Ces résultats indiquent que seuls le taux plasmatique de leucocytes varient de façon significative en présence de l'allèle muté CYP2C19\*2. Le tableau 12 montre que cette variation est retrouvée principalement chez les femmes. L'analyse par régression multiple réalisée séparément chez les hommes et les femmes montre que les taux plasmatiques de CRP augmentent de façon significative chez les femmes seulement. Toutefois, dans la population totale, les taux plasmatiques de CRP ne varient pas de façon significative (tableau 14).

#### 4. Polymorphisme et paramètres lipidiques.

Les paramètres inflammatoires influençant de nombreux paramètres biologiques, nous avons étudié les taux plasmatiques des triglycérides en fonction de la présence des allèles mutés. Les résultats sont présentés sur la figure 56 et le tableau 15.

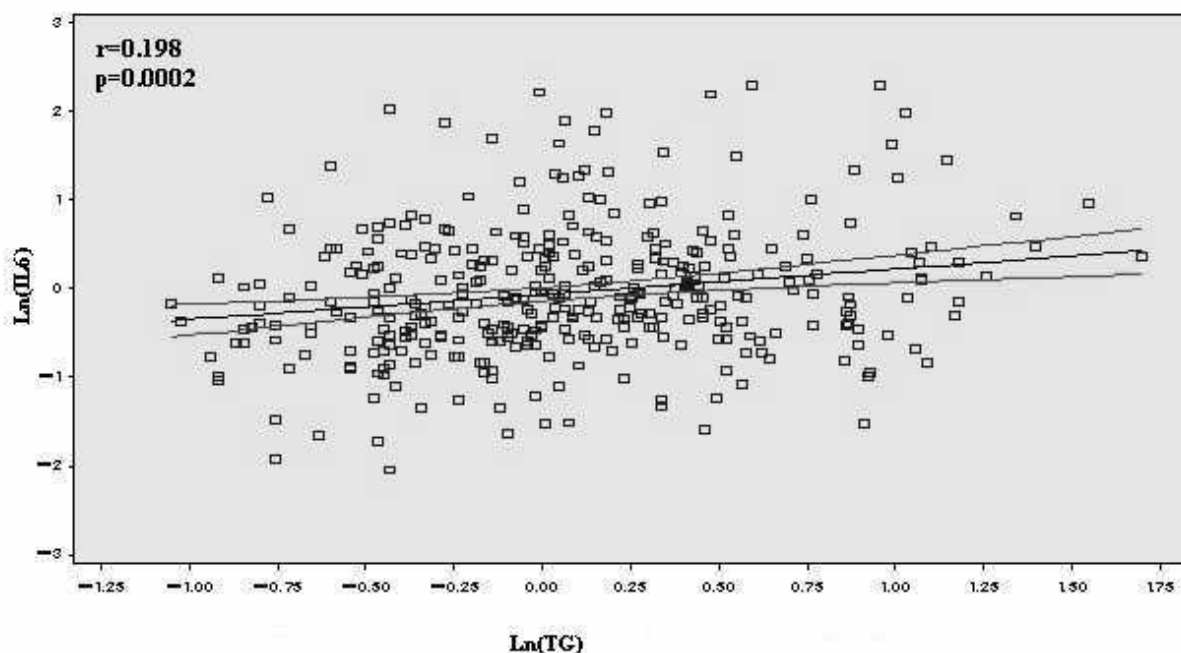


*Figure 56 : Influence du polymorphisme CYP2C19\*2 sur le taux plasmatique de triglycérides dans la population supposée saine de la Cohorte Stanislas.*

	Hommes n = 178		Femmes n= 181	
	$\beta$	p	$\beta$	p
<b>Ln (TG)</b>	0,17726	0,0206 (*)	0,00546	0,9372 (*)

*Tableau 15 : Analyse par régression multiple de l'association entre les taux plasmatiques de triglycérides et l'allèle muté CYP2C19\*2.*

Les taux plasmatiques de triglycérides sont souvent une conséquence de l'augmentation des taux plasmatiques d'interleukine-6 (Nonogaki *et al.*, 1995 ; Yudkin *et al.*, 2000). Nous avons donc recherché s'il existait dans notre population un lien entre l'augmentation des taux d'interleukine-6 et les taux plasmatiques de triglycérides, les résultats sont présentés sur la figure 57.



**Figure 57 :** Etude de corrélation entre les taux plasmatiques d'interleukine-6 et de triglycérides dans la population de la Cohorte Stanislas.

Cette figure montre qu'il existe une forte corrélation entre les taux plasmatiques d'interleukine-6 et de triglycérides dans la population de la Cohorte Stanislas.

Nous avons également étudié deux autres paramètres lipidiques, les HDL-cholestérol et l'apolipoprotéine B. Sur le tableau 16 sont présentés les concentrations plasmatiques de ces paramètres lipidiques en fonction du génotype.

	*1 / *1	*1 / *2	*2 / *2	*1 / *2 + *2 / *2	p
<b>I. Génotype</b>	GG n=242	GA n=102	AA n=15	AA + GA n=117	
<b>HDL-cholestérol (g/L)</b>	1,66 (0,49)	1,54 (0,41)	1,56 (0,47)	1,55 (0,42)	0,0284
<b>Apo B (g/L)</b>	1,01 (0,22)	1,02 (0,22)	1,20 (0,25)	1,05 (0,23)	ns

**Tableau 16 :** Analyse de régression des différents paramètres lipidiques HDL-cholestérol et apolipoprotéine B. Les valeurs sont exprimées en logarithme népérien.  $\beta$  représente la valeur moyenne chez les hommes ou femmes pour la variable testée, p est le facteur de significativité statistique : (\*),  $p < 0.05$ , (\*\*),  $p < 0.01$ , (\*\*\*),  $p < 0.001$ .

Nous avons réalisé une analyse de régression pour les taux plasmatiques de HDL et d'apolipoprotéine B séparément chez les hommes et les femmes. Les résultats sont présentés dans le tableau 17.

	Hommes n= 178		Femmes n=181	
II.	$\beta$	p	$\beta$	p
<b>Ln (HDL)</b>	-0,09493	0,04094 (*)	-0,00651	0,8659
<b>Ln (ApoB)</b>	0,00222	0,9478	0,01411	0,7095

*Tableau 17 : Analyse de régression de deux paramètres biologiques : les triglycérides (TG) et les High Density Lipoprotein (HDL). Les valeurs sont exprimées en logarithme népérien..  $\beta$  représente la valeur moyenne chez les hommes ou femmes pour la variable testée, p est le facteur de significativité statistique : (\*),  $p < 0.05$ , (\*\*),  $p < 0.01$ , (\*\*\*),  $p < 0.001$ .*

Nous pouvons constater que seuls les taux plasmatiques de HDL-cholestérol varient de façon significative chez les individus porteurs de l'allèle muté CYP2C19\*2. L'analyse de régression statistique montre que cette variation est significative chez les hommes mais pas chez les femmes.

En conclusion, nous avons montré que les taux plasmatiques d'IL-6, des leucocytes et des triglycérides augmentent en présence de l'allèle muté CYP2C19\*2 alors que les taux plasmatiques de TNF- $\alpha$ , de CRP, des HDL et de l'apolipoprotéine B ne varient pas de façon significative en présence de l'allèle muté CYP2C19\*2. Enfin, nous avons également constaté que, de façon générale, ces variations ne sont pas différentes d'un sexe à l'autre.

## 5. Discussion.

Les fréquences alléliques obtenues dans cette population pour les mutations 681G>A et 990 C>T sont de 18 %. Cette fréquence est identique à celle obtenue pour la population testée dans l'étude de la corrélation entre la pression sanguine et l'allèle muté CYP2C19\*2.

### 1. Polymorphismes et facteurs inflammatoires.

Différents facteurs inflammatoires tels que des cytokines pro-inflammatoires notamment les interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et interleukine-6 (IL-6), le TNF- $\alpha$ , la protéine C

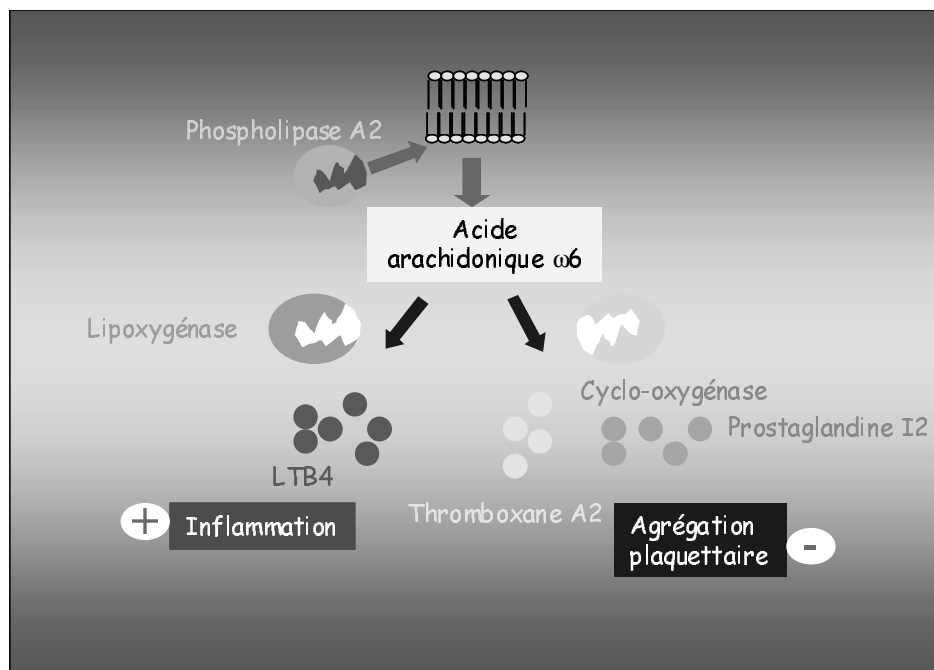


réactive et les leucocytes sont impliqués dans la réaction inflammatoire observée dans certaines maladies cardiovasculaires (Blake *et al.*, 2003). De nombreuses études décrivent l'effet des cytokines sur les activités des cytochromes P450. Les cytokines pro-inflammatoires sont principalement responsables de la diminution de l'activité des cytochromes P450 (Morgan, 2001), cependant certaines études décrivent l'augmentation des cytochromes P450 en présence de cytokines. Toutefois, peu d'études concernent l'effet du polymorphisme des cytochromes P450 sur les facteurs inflammatoires. Seule une étude montre un lien entre l'activité de CYP2C19 et les taux plasmatiques d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  (Frye *et al.*, 2002). Dans cette étude, les auteurs observent une augmentation des taux d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  quand l'activité de CYP2C19 est diminuée. Cependant, la diminution de l'activité de CYP2C19 pourrait être une conséquence de l'augmentation des concentrations d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ . Ces données coïncident avec les résultats que nous avons obtenus dans ce travail. En effet, les taux plasmatiques d'IL-6 sont plus importants chez les individus porteurs des mutations 681A et 990T, responsables d'une diminution de l'activité de CYP2C19. Les taux plasmatiques de TNF- $\alpha$  ne sont pas augmentés de façon très significative chez les individus porteurs de l'allèle muté CYP2C19\*2.

Parmi les autres facteurs inflammatoires étudiés, seuls les taux plasmatiques des leucocytes sont liés positivement à la présence de l'allèle muté CYP2C19\*2. L'augmentation des taux de leucocytes se trouve principalement chez les femmes porteuses de l'allèle muté CYP2C19\*2. Cette variation entre hommes et femmes peut être due à différents facteurs, notamment la présence d'hormones sexuelles telles que les oestrogènes. En effet, il a été démontré que les oestrogènes et notamment le 17- $\beta$ - estradiol diminue l'infiltration des leucocytes après une blessure vasculaire (Tiidus, 2003 ; Xing *et al.*, 2004). En revanche, les taux plasmatiques de CRP ne varient pas de façon significative. Ceci peut s'expliquer par le fait que la population que nous avons étudiée présente une moyenne d'âge de 45 ans.

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude montrent que le polymorphisme du cytochrome P450 2C19 : CYP2C19\*2 pourrait provoquer ou contribuer au développement d'une réaction inflammatoire. Cette réaction inflammatoire pourrait s'expliquer par l'augmentation des quantités de facteurs inflammatoires liée à un excès d'acide arachidonique non métabolisé due à la non-fonctionnalité de la protéine tronquée issue de l'allèle muté CYP2C19\*2. En effet, l'enzyme CYP2C19 issue du gène non muté métabolise l'acide arachidonique en acides eicosanoïques : les HETEs et les EETs (Bylund *et al.*, 1998). Parmi

les différents EETs produits, le 8,9-EET possède des propriétés anti-inflammatoires (Node *et al.*, 1999). L'enzyme non fonctionnelle issue du gène muté CYP2C19\*2 ne produit donc pas ce métabolite privant ainsi l'organisme des propriétés anti-inflammatoires du 8,9-EET. Cette réaction inflammatoire pourrait également s'expliquer par la présence de leucotriène B4. En effet, le leucotriène B4 (LTB4) est produit à partir de l'acide arachidonique par la 5-lipoxygénase (Sala *et al.*, 1998). Le LTB4 est impliqué dans l'amplification de la réaction inflammatoire. En effet, c'est un puissant chemoattracteur, il active les leucocytes et permet leur adhésion ainsi que celle des neutrophiles aux cellules endothéliales. Il est également responsable de la génération d'espèces réactives de l'oxygène dans les granulocytes et les macrophages (Yokomizo *et al.*, 2001). Enfin, les leucotriènes interviennent également dans la production de leucocytes qui sont responsables de la sécrétion d'interleukine-6 (Suzuki *et al.*, 1990). De plus, il a été démontré que dans une lignée d'ostéoblastes humains, un traitement avec de l'acide arachidonique produit une augmentation de l'expression d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  (Bordin *et al.*, 2003).



**Figure 58** : Métabolisme de l'acide arachidonique, implication du LTB4, du thromboxane A2 et de la prostaglandine I2 dans la réaction inflammatoire et l'agrégation plaquettaire

Toutes ces données pourraient ainsi expliquer le lien entre l'allèle muté CYP2C19\*2 et certains facteurs inflammatoires tels que l'IL-6 décrite par de nombreuses études comme le principal candidat marqueur de la réaction inflammatoire associée aux facteurs de risques cardiovasculaires (Yudkin *et al.*, 2000 ; Bermudez *et al.*, 2002).

## ***2. Polymorphisme et paramètres lipidiques.***

Dans la population que nous avons étudiée, seuls les taux plasmatiques de triglycérides sont associés de façon positive avec l'allèle muté CYP2C19\*2. Ceci pourrait s'expliquer par un rôle possible de l'acide arachidonique et/ou de l'IL-6. En effet, il a été démontré que chez des personnes ayant un régime supplémenté en acide linoléique, précurseur de l'acide arachidonique, le taux de triglycérides plasmatique est augmenté (Kestin *et al.*, 1990). Ces données indiquent donc qu'une augmentation de la concentration en acide arachidonique est suivie d'une augmentation de la concentration de triglycérides comme observé dans cette étude.

Nous avons également démontré que les taux plasmatiques de triglycérides sont corrélés avec les taux d'IL-6. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature puisqu'il a été démontré qu'une augmentation de la sécrétion d'IL-6 entraîne une augmentation de 2 fois des triglycérides plasmatiques (Fernandez-Real *et al.*, 2000 ; Mendall *et al.*, 1997). Il a également été constaté que l'IL-6 pouvait augmenter la sécrétion des triglycérides hépatiques chez les rats (Nonogaki *et al.*, 1995). De plus, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  stimulent la lipolyse et augmentent la libération d'acide gras dans le foie (Nonogaki *et al.*, 1995 ; Yudkin *et al.*, 2000).

Dans la population que nous avons étudiée, les taux plasmatiques de HDL-cholestérol et d'apolipoprotéine B ne sont pas influencés par la présence de l'allèle muté CYP2C19\*2.

L'ensemble de ces données laisse suggérer que les individus porteurs de la mutation CYP2C19\*2 sont des « métaboliseurs lents » vis-à-vis de l'acide arachidonique, l'excès d'acides gras étant corrélé à un risque de réaction inflammatoire. L'augmentation des taux d'IL-6 sont corrélés positivement à une hypertriglycémie, tous les deux associés au risque d'athérosclérose. L'acide arachidonique étant présent dans les graisses d'origines animales, un régime composé d'acides gras oméga-3 pourrait empêcher l'augmentation des concentrations circulantes de triglycérides et d'interleukine-6.

En conclusion, ces résultats nous ont montré que le polymorphisme CYP2C19\*2 ne modifie pas les pressions sanguines systoliques et diastoliques. En revanche, la présence de

l'allèle muté CYP2C19\*2 modifie les taux plasmatiques de différents marqueurs de la réaction inflammatoire notamment les concentrations d'IL-6 et de leucocytes mais également de certains paramètres lipidiques tels que les triglycérides. Toutes ces données laissent à penser que même si le polymorphisme CYP2C19\*2 n'a pas d'effet direct sur la pathologie variqueuse, il joue un rôle important dans le développement de la réaction inflammatoire observée dans cette pathologie mais également dans d'autres pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose. La présence de différentes corrélations entre le polymorphisme CYP2C19\*2 et certains facteurs inflammatoires suggèrent que CYP2C19 pourrait être un nouveau gène candidat dans ces maladies cardiovasculaires.

# CONCLUSION GENERALE

## ET PERSPECTIVES.

Au cours de ces travaux, nous avons caractérisé le profil d'expression des cytochromes P450 dans des tissus de veines saphènes humaines et dans des cellules vasculaires : les cellules endothéliales et musculaire lisses et nous avons montré que l'expression de certaines isoformes de cytochromes P450 pouvaient être modifiées dans la pathologie variqueuse et sous l'influence de molécules hypocholestérolémiantes : les statines.

Dans les veines saphènes humaines, nous avons montré que l'expression des cytochromes P450 1B1, 2C, 2E1, 2J2, 3A5 étaient augmentés dans les échantillons variqueux. Cette augmentation pourrait être due à l'augmentation du volume des cellules musculaires lisses observé dans les échantillons de veines variqueuses. Nous avons étudié la relation entre le volume des cellules musculaires lisses et le taux des cytochromes P450 mais aucune corrélation n'a été constatée entre l'augmentation du volume des cellules musculaires lisses et celle des cytochromes P450. Il semble donc plus probable que les modifications d'expression de ces cytochromes P450 soient dues aux changements qui se produisent dans la pathologie variqueuse. En effet, le stress mécanique (Fisslthaler *et al.*, 2001), les conditions hypoxiques (Zhu *et al.*, 2000 ; Bylund *et al.*, 1998) et inflammatoires (Morgan, 2001) peuvent influencer l'expression des cytochromes P450. Ces premiers résultats ouvrent l'hypothèse que la modification de l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique telles que les cytochromes P450 ait pour conséquence une modification de la production de métabolites vaso-actifs tels que les acides epoxyeicosatriénoïques (EETs) ou les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs). L'augmentation des cytochromes P450 et donc des métabolites vaso-actifs contribuerait il à la dérégulation de l'homéostasie vasculaire et aggraverait la pathologie variqueuse ? La production de métabolites vaso-actifs dans les organes vasculaires ainsi que leur rôle dans la régulation du tonus vasculaire est bien documenté mais la variation de leur production dans des maladies cardiovasculaires reste

encore peu étudiée. Quelques études décrivent leur implication dans l'athérosclérose mais peu de choses sont connues concernant leur rôle dans la pathologie variqueuse. Cet aspect mériterait pourtant une plus grande attention car la dérégulation du tonus vasculaire reste un grand point important de la pathologie variqueuse .

L'autre question que suggère ces résultats concerne la régulation possible de ces cytochromes P450 par certains composés utilisés en pathologie cardiovasculaire. En effet, la régulation des cytochromes P450 a largement été explorée dans le foie mais commence seulement à être explorée dans les tissus vasculaires et notamment les cellules endothéliales.

Il serait intéressant de connaître la régulation des cytochromes P450 dans les cellules endothéliales afin de pouvoir envisager l'utilisation de certaines molécules afin de traiter ou au moins d'enrayer en partie, l'évolution de la pathologie variqueuse. Dans cette étude, nous avons étudié la localisation précise de différents cytochromes P450 dans les cellules endothéliales et musculaires lisses. Cette localisation, nous a permis de réaliser quelques études de régulation. Pour cela, nous avons utilisé les statines qui sont des molécules hypocholestérolémiantes possédant de nombreux effets pléiotropiques. Depuis quelques années, ces différentes propriétés se sont avérées bénéfiques dans les maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, dans lesquelles l'endothélium est très impliqué.

Dans ce travail, nous avons montré que certaines statines notamment la lovastatine et l'atorvastatine jouaient un rôle dans la régulation des cytochromes P450 2C, 2J2 et 3A5 dans les cellules endothéliales. Ces résultats préliminaires laissent suggérer que les statines pourraient moduler aussi le tonus vasculaire, cela par leur effet sur la régulation des cytochromes P450. En effet, il a été démontré que chez des patients atteints d'hypercholestérolémie sévère, les statines améliorent les propriétés vasodilatatrices de l'endothélium. Toutefois, pour tenter d'expliquer ces effets, les chercheurs se sont intéressés à la modulation de la production du monoxyde d'azote, médiateur clé du tonus vasculaire (Hernandez-Perera *et al.*, 1998), cependant, il semble que les métabolites vaso-actifs produits par les cytochromes P450 soient tout aussi importants dans cette régulation, il serait alors logique de s'intéresser également à l'effet des statines sur la production de ces molécules vaso-actives.

Enfin, nous avons également eu l'opportunité, dans le cadre d'une collaboration avec la société Roche Diagnostics, d'étudier les effets du polymorphisme des cytochromes P450 de la famille 2C sur le tonus vasculaire et la réaction inflammatoire. Cette étude nous a permis de montrer qu'il n'y avait pas de relation entre la présence d'une protéine CYP2C19 mutée inactive et une augmentation de la tension artérielle. Par contre, nous avons constaté une forte corrélation entre la présence de la protéine CYP2C19 mutée et certains paramètres inflammatoires tels que l'interleukine-6, le TNF- $\alpha$ , la CRP et le taux de leucocytes. Ces résultats laissent à penser que les polymorphismes des cytochromes P450 jouent aussi un rôle dans la réaction inflammatoire observée dans certaines maladies cardiovasculaires.

Pris dans son ensemble, ce travail a permis de montrer que la pathologie variqueuse faisait varier l'expression de certaines isoformes de cytochromes P450. Par ailleurs, l'expression de ces cytochromes P450 exprimés dans les cellules vasculaires pouvaient être modulée par certaines molécules hypocholestérolémiantes : les statines. Enfin, les polymorphismes des cytochromes P450 peuvent également intervenir dans la pathologie vasculaire à composante inflammatoire. Ces résultats posent alors la question de la modulation de la production des molécules vaso-actives dans la pathologie variqueuse et d'un éventuel traitement de cette pathologie par les molécules inhibitrices de l'HMGCoA réductase ou par des inhibiteurs de cytochromes P450.

# BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Rahman SZ, Salama SA, Au WW, Hamada FA.  
Role of polymorphic CYP2E1 and CYP2D6 genes in NNK-induced chromosome aberrations in cultured human lymphocytes.  
Pharmacogenetics. 2000 ; **10** : 239-49.
- Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, Beaune P, Guillouzo A.  
Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture.  
Mol Pharmacol. 1993 ; **44** : 707-715.
- Adas F, Berthou F, Picart D, Lozac'h P, Beauge F, Amet Y.  
Involvement of cytochrome P450 2E1 in the (omega-1)-hydroxylation of oleic acid in human and rat liver microsomes.  
J Lipid Res. 1998 ; **39** : 1210-1219.
- Adeagbo AS.  
Endothelium-derived hyperpolarizing factor: characterization as a cytochrome P450 1A-linked metabolite of arachidonic acid in perfused rat mesenteric prearteriolar bed.  
Am J Hypertens. 1997 ; **10** : 763-71.
- Aklillu E, Oscarson M, Hidestrand M, Leidvik B, Otter C, Ingelman-Sundberg M.  
Functional analysis of six different polymorphic CYP1B1 enzyme variants found in an Ethiopian population.  
Mol Pharmacol. 2002 ; **61** : 586-594.
- Albrightson, CR, Short B, Dytko G, Zabko-Potapovich B, Brickson B, Adams JL, and Griswold DE.  
Selective inhibition of 5-lipoxygenase attenuates glomerulonephritis in the rat.  
Kidney Int. 1994 ; **45** : 1301-1310.
- Alexander DL, Zhang L, Foroozesh M, Alworth WL, Jefcoate CR.  
Metabolism-based polycyclic aromatic acetylene inhibition of CYP1B1 in 10T1/2 cells potentiates Aryl Hydrocarbon Receptor Activity.  
Toxicol. Applied Pharmacol. 1999 ; **161** : 123-139.
- Alonso-Galicia M, Sun CW, Falck JR, Harder DR, Roman RJ.  
Contribution of 20-HETE to the vasodilator actions of nitric oxide in renal arteries.  
Am J Physiol Renal Physiol. 1998 ; **275** : F370-F378.
- Amaral SL, Maier KG, Schippers DN, Roman RJ, Greene AS.  
CYP4A metabolites of arachidonic acid and VEGF are mediators of skeletal muscle angiogenesis.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 ; **284** : H1528-H1535.
- Ambrosi P, Aillaud MF, Habib G, Kreitmann B, Metras D, Luccioni R, Bouvenot G, Juhan-Vague I.  
Fluvastatin decreases soluble thrombomodulin in cardiac transplant recipients.  
Thromb Haemost. 2000 ; **83** : 46-48.  
Amet Y, Berthou F, Baird S, Dreano Y, Bail JP and Menez JF



Validation of the ( $\omega$ -1)-hydroxylation of lauric acid as an *in vitro* substrate probe for human liver CYP2E1.

Biochem. Pharmacol. 1995 ; **50** : 1775-1782.

Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P.

The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion.

N Engl J Med. 1995 ; **332** : 488-493.

Ando J, Kamiya A.

Blood flow and vascular endothelial cell function.

Front Med Biol Eng. 1993 ; **5** : 245-64.

Andreou ER, Prokipcak RD.

Analysis of human CYP7A1 mRNA decay in HepG2 cells by reverse transcription-polymerase chain reaction.

Arch Biochem Biophys. 1998 ; **357** : 137-146.

Anttila S, Hukkanen J, Hakkola J, Stjernvall T, Beaune P, Edwards RJ, Boobis AR, Pelkonen O, Raunio H.

Expression and localization of CYP3A4 and CYP3A5 in human lung.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1997 ; **16** : 242-249.

Aoyama T, Yamano S, Waxman DJ, Lapenson DP, Meyer UA, Fischer V, Tyndale R, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV, et al.

Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine.

J Biol Chem. 1989 ; **264** : 10388-10395.

Araya Z, Wikvall K.

6 $\alpha$ -hydroxylation of taurochenodeoxycholic acid and lithocholic acid by CYP3A4 in human liver microsomes.

Biochim Biophys Acta. 1999 ; **1438** : 47-54.

Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK

Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 ; **91** : 7583-7587.

Archer SL, Gragasin FS, Wu X, Wang S, McMurtry S, Kim DH, Platonov M, Koshal A, Hashimoto K, Campbell WB, Falck JR, Michelakis ED.

Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels.

Circulation. 2003 ; **107** : 769-776.

Arnould T, Janssens D, Michiels C, Remacle J. Related Articles, Links

Effect of aescine on hypoxia-induced activation of human endothelial cells.

Eur J Pharmacol. 1996 ; **315** : 227-33.

Aronow BJ, Toyokawa T, Canning A, Haghighi K, Delling U, Kranias E, Molckentin JD, Dorn GW 2nd.

Divergent transcriptional responses to independent genetic causes of cardiac hypertrophy.

Physiol Genomics. 2001 ; **6** : 19-28.

- Ayajiki K, Okamura T, Fujioka H, Imaoka S, Funae Y and Toda N.  
Involvement of CYP3A-derived arachidonic acid metabolite(s) in responses to endothelium derived K<sup>+</sup> channel opening substance in monkey lingual artery.  
Br. J. Pharmacol. 1999 ;**128** : 802-808.
- Ayajiki K, Fujioka H, Toda N, Okada S, Minamiyama Y, Imaoka S, Funae Y, Watanabe S, Nakamura A, Okamura T.  
Mediation of arachidonic acid metabolite(s) produced by endothelial cytochrome P-450 3A4 in monkey arterial relaxation.  
Hypertens Res. 2003 ; **26** : 237-243.
- Badier-Commander C, Verbeuren T, Lebard C, Michel JB, Jacob MP.  
Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation.  
J Pathol. 2000 ; **192** : 105-112.
- Badier-Commander C, Couvelard A, Henin D, Verbeuren T, Michel JB, Jacob MP  
Smooth muscle cell modulation and cytokine overproduction in varicose veins. An in situ study.  
J. Pathol. 2001 ; **193** : 398-407.
- Badr, KF.  
Glomerulonephritis: roles of lipoxygenase pathways in pathophysiology and therapy.  
Current Opin Nephrol Hypertens. 1997 ; **6** : 111-118.
- Baes M, Gulick T, Choi HS, Martinoli MG, Simha D, Moore DD.  
A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements.  
Mol Cell Biol. 1994 ; **14** : 1544-1552.
- Bahadur N, Leathart JB, Mutch E, Steimel-Crespi D, Dunn SA, Gilissen R, Houdt JV, Hendrickx J, Mannens G, Bohets H, Williams FM, Armstrong M, Crespi CL, Daly AK.  
CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6 $\alpha$ -hydroxylase activity in human liver microsomes.  
Biochem Pharmacol. 2002 ; **64** : 1579-1589.
- Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K.  
Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers.  
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000 ; **9** : 3-28.
- Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, Weinryb I, Guida M, Hopkins PJ, Warner N, Hall J.  
Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4.  
Clin Pharmacol Ther. 1999 ; **66** : 288-294.
- Bamberg AM, Milde-Langosch K, Loning T, Bamberger CM  
The glucocorticoid receptor is specifically expressed in the stromal compartment of the human endometrium.  
J Clin. Endocrinol. Metab. 2001, **86** : 5071-5074.
- Bang L, Goa K.  
Oxcarbazepine: a review of its use in children with epilepsy.  
Paediatr Drugs. 2003 ; **5** : 557-573.

- Baron JM, Zwadlo-Klarwasser G, Jugert F, Hamann W, Rubben A, Mukhtar H, Merk HF.  
Cytochrome P450 1B1: a major P450 isoenzyme in human blood monocytes and macrophage subsets.  
*Biochem Pharmacol.*, 1998, **56** :1105-1110.
- Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R.  
Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor.  
*Circulation.* 1996 ; **94** : 3341-3347.
- Bayanov AA, Brunt AR.  
Role of hypoxia and constitutionally different resistance to hypoxia/stress as the determiners of individual profile of cytochrome P450 isozyme activity.  
*Gen Pharmacol.* 1999 ; **33** : 355-361.
- Beasley D, McGuiggin ME  
Interleukin 1 induces prostacyclin-dependent increase in cyclic AMP production and does not affect cyclic GMP production in human vascular smooth muscle cells.  
*Cytokine.* 1995 ; **7** : 417-426
- Beigneux AP, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR.  
Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 2002 ; **293** : 145-149.
- Bell DR, Plant NJ, Rider CG, Na L, Brown S, Ateitalla I, Acharya SK, Davies MH, Elias E, Jenkins NA, et al.  
Species-specific induction of cytochrome P-450 4A RNAs: PCR cloning of partial guinea-pig, human and mouse CYP4A cDNAs.  
*Biochem J.* 1993 ; **294** : 173-180.
- Bellamine A, Wang Y, Waterman MR, Gainer JV 3rd, Dawson EP, Brown NJ, Capdevila JH.  
Characterization of the CYP4A11 gene, a second CYP4A gene in humans.  
*Arch Biochem Biophys.* 2003 ; **409** : 221-227.
- Bellosta S, Ferri N, Arnaboldi L, Bernini F, Paoletti R, Corsini A.  
Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes.  
*Diabetes Care.* 2000 ; **23** : B72-B78.
- Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM.  
Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 ; **22** : 1668-1673.
- Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L, Sydow-Backman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P, Berkenstam A.  
Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 ; **95** : 12208-12213.
- Bishop-Bailey D, Hla T, Mitchell JA.  
Cyclo-oxygenase-2 in vascular smooth muscle.  
*Int J Mol Med.* 1999 ; **3** : 41-48.
- Birks EK, Bousamra M, Presberg K, Marsh JA, Effros RM, Jacobs ER.  
Human pulmonary arteries dilate to 20-HETE, an endogenous eicosanoid of lung tissue.  
*Am J Physiol.* 1997 ; **272** : L823-L829.

- Blake GJ, Ridker PM.  
C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2003 ; **41**, 37S-42S.
- Blaisdell J, Mohrenweiser H, Jackson J, Ferguson S, Coulter S, Chanas B, Xi T, Ghanayem B, Goldstein JA.  
Identification and functional characterization of new potentially defective alleles of human CYP2C19. *Pharmacogenetics.* 2002 ; **12** : 703-711.
- Blay JY, Rossi JF, Wijdenes J, Menetrier-Caux C, Schemann S, Negrier S, Philip T, Favrot M Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma. *Int J Cancer.* 1997 ; **72** : 424-430.
- Blumberg B, Sabbagh W Jr, Juguilon H, Bolado J Jr, van Meter CM, Ong ES, Evans RM.  
SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev.* 1998 ; **12** : 3195-3205.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA  
Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994 ; **368** : 850-853
- Bolz SS, Fisslthaler B, Pieperhoff S, De Wit C, Fleming I, Busse R, Pohl U.  
Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated Ca(2+) changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J.* 2000 ; **14** : 255-260.
- Bonin LR, Madden K, Shera K, Ihle J, Matthews C, Aziz S, Perez-Reyes N, McDougall JK, Conroy SC.  
Generation and characterization of human smooth muscle cell lines derived from atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 ; **19** : 575-587.
- Bordin L, Priante G, Musacchio E, Giunco S, Tibaldi E, Clari G, Baggio B.  
Arachidonic acid-induced IL-6 expression is mediated by PKC alpha activation in osteoblastic cells. *Biochemistry.* 2003 ; **42** : 4485-4491.
- Botto F, Seree E, el Khyari S, de Sousa G, Massacrier A, Placidi M, Cau P, Pellet W, Rahmani R, Barra Y.  
Tissue-specific expression and methylation of the human CYP2E1 gene. *Biochem Pharmacol.* 1994 ; **48** : 1095-1103.
- Bouchardy C, Hirvonen A, Coutelle C, Ward PJ, Dayer P and benhamou S  
Role of alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P-4502E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract  
*Int. J. Cancer.* 2000 ; **87** : 734-740
- Bradbury AW, Murie JA, Ruckley CV.  
Role of the leucocyte in the pathogenesis of vascular disease. *Br J Surg.* 1993 ; **80** : 1503-1512.
- Brockmoller J, Rost KL, Gross D, Schenkel A, Roots I  
Phenotyping of CYP2C19 with enantiospecific HPLC-quantification of R- and S-mephenytoin and comparison with the intron4/exon5 G-->A-splice site mutation. *Pharmacogenetics.* 1995 ; **5** : 80-88.

Brooks BA, McBride OW, Dolphin CT, Farrall M, Scambler PJ, Gonzalez FJ, Idle JR.  
The gene CYP3 encoding P450pcn1 (nifedipine oxidase) is tightly linked to the gene COL1A2 encoding collagen type 1 alpha on 7q21-q22.1.  
Am J Hum Genet. 1988 ; **43** : 280-284.

Brown J, Reading SJ, Jones S, Fitchett CJ, Howl J, Martin A, Longland CL, Michelangeli F, Dubrova YE, Brown CA.  
Critical evaluation of ECV304 as a human endothelial cell model defined by genetic analysis and functional responses: a comparison with the human bladder cancer derived epithelial cell line T24/83.  
Lab Invest. 2000 ; **80** : 37-45.

Burk O, Tegude H, Koch I, Hustert E, Wolbold R, Glaeser H, Klein K, Fromm MF, Nuessler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Wojnowski L.  
Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine.  
J Biol Chem. 2002 ; **277** : 24280-24288.

Bylund J, Ericsson J, Oliw EH.  
Analysis of cytochrome P450 metabolites of arachidonic and linoleic acids by liquid chromatography-mass spectrometry with ion trap MS.  
Anal Biochem. 1998 ; **265** : 55-68.

Bylund J, Finnstrom N, Oliw EH.  
Gene expression of a novel cytochrome P450 of the CYP4F subfamily in human seminal vesicles.  
Biochem Biophys Res Commun. 1999 ; **261** : 169-174.

Bylund J, Hildestrand M, Ingelman-Sundberg M, Oliw EH.  
Identification of CYP4F8 in human seminal vesicles as a prominent 19-hydroxylase of prostaglandin endoperoxides.  
J Biol Chem. 2000 ; **275** : 21844-21849.

Bylund J, Bylund M, Oliw EH.  
cDNA Cloning and Expression of CYP4F12, a Novel Human Cytochrome P450.  
Biochem Biophys Res Commun. 2001 ; **280** : 892-897

Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, and Harder DR.  
Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. Circ Res. 1996 ; **78** : 415-423.

Campbell WB, Harder DR.  
Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone.  
Circ Res. 1999 ; **84** : 484-488.

Campbell WB.  
New role for epoxyeicosatrienoic acids as anti-inflammatory mediators.  
Trends Pharmacol Sci. 2000 ; **21** : 125-127.

Capdevila JH, Falck JR and Harris RC  
Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation : molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase  
J. Lipid. Res. 2000 ; **41** : 1.

Capdevila JH, Falck JR.  
The CYP P450 arachidonic acid monooxygenases: from cell signaling to blood pressure regulation.

- Biochem Biophys Res Commun. 2001 ; 285 : 571-576.  
Capdevila JH, Nakagawa K, Holla V.  
The CYP P450 arachidonate monooxygenases: enzymatic relays for the control of kidney function and blood pressure.  
Adv Exp Med Biol. 2003 ; 525 : 39-46.
- Celander MC, Moore MJ, Stegeman JJ.  
Cellular localization of CYP3A proteins in various tissues from pilot whale (*Globicephala melas*).  
Environ. Toxicol. Pharmacol. 2000 ; 8 : 245-253.
- Chang TK, Teixeira J, Gil G, Waxman DJ.  
The lithocholic acid 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450, CYP 3A10, is an active catalyst of steroid-hormone 6 beta-hydroxylation.  
Biochem J. 1993 ; 291 : 429-433.
- Chang TK, Yu L, Maurel P, Waxman DJ.  
Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines.  
Cancer Res. 1997 ; 57 : 1946-1954.
- Chang TK, Lee WB, Ko HH.  
Trans-resveratrol modulates the catalytic activity and mRNA expression of the procarcinogen-activating human cytochrome P450 1B1.  
Can J Physiol Pharmacol. 2000 ; 78 : 874-81.
- Chang BL, Zheng SL, Isaacs SD, Turner A, Hawkins GA, Wiley KE, Bleecker ER, Walsh PC, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J.  
Polymorphisms in the CYP1B1 gene are associated with increased risk of prostate cancer.  
Br J Cancer. 2003 ; 89 : 1524-1529.
- Chen JK, Falck JR, Reddy KM, Capdevila J, and Harris RC.  
Epoxyeicosatrienoic acids and their sulfonimide derivatives stimulate tyrosine phosphorylation and induce mitogenesis in renal epithelial cells.  
J Biol Chem. 1998 ; 273 : 29254-29261.
- Chen JK, Wang DW, Falck JR, Capdevila J, Harris RC  
Transfection of an active cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase indicates that 14,15-epoxyeicosatrienoic acid functions as an intracellular second messenger in response to epidermal growth factor.  
J. Biol. Chem. 1999 ; 274 : 4764-4769
- Chen Y, Ferguson SS, Negishi M, Goldstein JA.  
Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor.  
J Pharmacol Exp Ther. 2004 ; 308 : 495-501.
- Cheng MK, McGiff JC, Carroll MA.  
Renal arterial 20-hydroxyeicosatetraenoic acid levels: regulation by cyclooxygenase.  
Am J Physiol Renal Physiol. 2003 ; 284 : F474-F479.
- Cheung B, Yan J, Smith SA, Nguyen T, Lee M, Kavallaris M, Norris MD, Haber M, Marshall GM.  
Growth inhibitory retinoid effects after recruitment of retinoid X receptor beta to the retinoic acid receptor beta promoter.  
Int J Cancer. 2003 ; 105 : 856-867.

Chevalier D, Lo-Guidice JM, Sergent E, Allorge D, Debuysere H, Ferrari N, Libersa C, Lhermitte M, Broly F.

Identification of genetic variants in the human thromboxane synthase gene (CYP5A1)

Mutat Res. 2001 ; **432** : 61-67.

Chèvremont M.

Notions de cytologie et histologie.

Liège : Desoer ; Paris : Maloine, 4<sup>ème</sup> édition, 1979-1980, pp691-743.

Chi JT, Chang HY, Guttorm H, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS, Wang Z, Rockson SG, Van de Rijn M, Bolstein D, Brown PO.

Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling.

Proc Natl Acad Sci USA. 2003 ; **100** : 10623-10628.

Chou FC, Tzeng SJ, Huang JD.

Genetic polymorphism of cytochrome P450 3A5 in Chinese.

Drug Metab Dispos. 2001 ; **29** : 1205-1209.

Christmas P, Ursino SR, Fox JW, Soberman RJ.

Expression of the CYP4F3 gene. tissue-specific splicing and alternative promoters generate high and low K(m) forms of leukotriene B(4) omega-hydroxylase.

J Biol Chem. 1999 ; **274** : 21191-21199.

Chung HC, Kim SH, Lee MG, Kim SG.

Increase in urea in conjunction with L-arginine metabolism in the liver leads to induction of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): the role of urea in CYP2E1 induction by acute renal failure.

Drug Metab Dispos. 2002 ; **30** : 739-746.

Ciolino HP, Yeh GC.

Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol.

Mol Pharmacol. 1999 ; **56** : 760-767.

Ciuffetti G, Mannarino E, Paltriccia R, Malagigi V, Sergi F, Paulisch P, Pasqualini L, Lupattelli G.

Leucocyte activity in chronic venous insufficiency.

Int Angiol. 1994 ; **13** : 312-316.

Cohen LH, van Leeuwen RE, van Thiel GC, van Pelt JF, Yap SH.

Equally potent inhibitors of cholesterol synthesis in human hepatocytes have distinguishable effects on different cytochrome P450 enzymes.

Biopharm Drug Dispos. 2000 ; **21** : 353-364.

Coleridge Smith PD, Thomas P, Scurr JH, Dormandy JA.

Causes of venous ulceration: a new hypothesis.

Br Med J (Clin Res Ed). 1988 ; **296** : 1726-1727.

Conney AH.

Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture.

Cancer Res. 1982 ; **42** : 4875-4917.

Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F

New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins.

Pharmacol Ther. 1999; **84** : 413-428.

Cosma G, Crofts F, Taioli E, Toniolo P, Garte S.  
Relationship between genotype and function of the human CYP1A1 gene.  
J Toxicol Environ Health. 1993 ; **40** : 309-316.

Cresteil T, Jaiswal AK, Eisen HJ.  
Transcriptional control of human cytochrome P1-450 gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-  
p-dioxin in human tissue culture cell lines.  
Arch Biochem Biophys. 1987 ; **253** : 233-240.

Cui X, Nelson DR, Strobel HW.  
A novel human cytochrome P450 4F isoform (CYP4F11): cDNA cloning, expression, and genomic  
structural characterization  
Genomics. 2000 ; **68** : 161-166.

Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, Goldstein JA.  
Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and  
arachidonic acid.  
Pharmacogenetics. 2001 ; **11** : 597-607.

Daikh BE, Lasker JM, Raucy JL, Koop DR.  
Regio- and stereoselective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P450 2C8 and 2C9.  
J Pharmacol Exp Ther. 1994 ; **271** : 1427-1433.

Das UN.  
Essential fatty acids as possible mediators of the actions of statins.  
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2001 ; **65** : 37-40.

Davidge ST, Baker PN, McLaughlin MK and Roberts JM  
Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoides through activation of  
prostaglandin H synthase.  
Circ Res. 1995 ; **77** : 274-283.

de Groot H, Rauhen U.  
Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids.  
Fundam Clin Pharmacol. 1998 ; **12** : 249-255.

Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B.  
Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1  
production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway.  
Circ Res. 1999 ; **85** : 394-402.

Demasi M, Cleland LG, Cook-Johnson RJ, Caughey GE, James MJ.  
Effects of hypoxia on monocyte inflammatory mediator production; dissociation between changes in  
COX-2 expression and eicosanoid synthesis.  
J Biol Chem. 2003 ; **278** : 38607-38616.

De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA.  
The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans.  
J Biol Chem. 1994 (a) ; **269** : 15419-15422.

De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA.  
Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin  
metabolism in Japanese.



Mol Pharmacol. 1994 (b) ; **46** : 594-598.

Desvergne B, Wahli W.

Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism.  
Endocr Rev. 1999 ; **20** : 649-688.

Dickmann LJ, Rettie AE, Kneller MB, Kim RB, Wood AJ, Stein CM, Wilkinson GR, Schwarz UI.  
Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9\*5) expressed among African Americans.  
Mol Pharmacol. 2001 ; **60** : 382-387.

Dimaraki EV, Jaffe CA.

Troglitazone induces CYP3A4 activity leading to falsely abnormal dexamethasone suppression test.  
J Clin Endocrinol Metab. 2003 ; **88** : 3113-3116.

Dinenno FA.

Hypoxic regulation of blood flow in humans. Alpha-adrenergic receptors and functional sympatholysis in skeletal muscle.

Adv Exp Med Biol. 2003 ; **543** : 237-248.

Doostdar H, Duthie SJ, Burke MD, Melvin WT, Grant MH.

The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line.  
FEBS Lett. 1988 ; **241** : 15-18.

Doostdar H, Grant MH, Melvin WT, Wolf CR, Burke MD.

The effects of inducing agents on cytochrome P450 and UDP-glucuronyltransferase activities in human HEPG2 hepatoma cells.  
Biochem Pharmacol. 1993 ; **46** : 629-635.

Drexler HG, Quentmeier H, Dirks WG, MacLeod RA.

Bladder carcinoma cell line ECV304 is not a model system for endothelial cells.  
In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2002 ; **38** : 185-186.

Drocourt L, Pascussi JM, Assenat E, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ.

Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes.  
Drug Metab Dispos. 2001 ; **29** : 1325-1331.

Dubey RK, Gillespie DG, Zacharia LC, Barchiesi F, Imthurn B, Jackson EK.

CYP450- and COMT-derived estradiol metabolites inhibit activity of human coronary artery SMCs.  
Hypertension., 2003, **41** : 807-813.

Earley S, Pastuszyn A, Walker BR.

Cytochrome p-450 epoxygenase products contribute to attenuated vasoconstriction after chronic hypoxia.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 ; **285** : H127-H136.

Eickelberg O, Roth M, Lorx R, Bruce V, Rudiger J, Johnson M, Block LH.

Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by beta2-adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells.  
J Biol Chem. 1999 ; **274** : 1005-1010.

- Eiselt R, Domanski TL, Zibat A, Mueller R, Presecan-Siedel E, Hustert E, Zanger UM, Brockmoller J, Klenk HP, Meyer UA, Khan KK, He YA, Halpert JR, Wojnowski L.  
Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants.  
*Pharmacogenetics*. 2001 ; **11** : 447-458.
- El-Sankary W, Plant NJ, Gibson GG, Moore DJ.  
Regulation of the CYP3A4 gene by hydrocortisone and xenobiotics: role of the glucocorticoid and pregnane X receptors.  
*Drug Metab Dispos*. 2000 ; **28** : 493-496.
- Ermert L, Ermert M, Duncker HR, Grimminger F, Seeger W.  
In situ localization and regulation of thromboxane A(2) synthase in normal and LPS-primed lungs.  
*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 ; **278** : L744-L753.
- Elkahwaji J, Robin MA, Berson A, Tinel M, Letteron P, Labbe G, Beaune P, Elias D, Rougier P, Escudier B, Duvillard P, Pessayre D.  
Decrease in hepatic cytochrome P450 after interleukin-2 immunotherapy.  
*Biochem Pharmacol*. 1999 ; **57** : 951-954.
- Endoh M, Kashem A, Yamauchi F, Yano N, Nomoto Y, Sakai H, Kurokawa K.  
Expression of thromboxane synthase in kidney tissues from patients with IgA nephropathy.  
*Clin Nephrol*. 1997 ; **47** : 168-175.
- Eriksson EE.  
Leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions, a complex web of dynamic cellular and molecular interactions.  
*Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2003 ; **3** : 309-325.
- Escalante B, Omata K, Sessa W, Lee SG, Falck JR, Schwartzman ML.  
20-hydroxyeicosatetraenoic acid is an endothelium-dependent vasoconstrictor in rabbit arteries.  
*Eur J Pharmacol*. 1993 ; **235** : 1-7.
- Falck JR, Lumin S, Blair I, Dishman E, Martin MV, Waxman DJ, Guengerich FP, Capdevila JH.  
Cytochrome P-450-dependent oxidation of arachidonic acid to 16-, 17-, and 18-hydroxyeicosatetraenoic acids.  
*J Biol Chem*. 1990 ; **265** : 10244-10249.
- Farin FM, Omiecinski CJ.  
Regiospecific expression of cytochrome P-450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue.  
*J Toxicol Environ Health*. 1993 ; **40** : 317-335.
- Farin FM, Pohlman TH and Omiecinski C  
Expression of cytochrome P450s and microsomal epoxyde hydrolase in primary cultures of human umbilical vein endothelial cells.  
*Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1994 ; **124** : 1-9.
- Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung NK, Lovett BD, Nowell PC, Blair IA, Rebbeck TR.  
Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 ; **95** : 13176-13181.
- Ferguson RJ, De Morais SM, Benhamou S, Bouchardy C, Blaisdell J, Ibeanu G, Wilkinson GR, Sarich TC, Wright JM, Dayer P, Goldstein JA.

A new genetic defect in human CYP2C19: mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin.  
J Pharmacol Exp Ther. 1998 ; **284** : 356-361.

Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W.  
Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects.  
J Clin Endocrinol Metab. 2000 ; **85** : 1334-1339.

Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, and Busse R.  
Cytochrome P-450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries.  
Nature. 1999 ; **401**: 493-497.

Fisslthaler B, Hinsch N, Chataigneau T, Popp R, Kiss L, Busse R, and Fleming I.  
Nifedipine increases cytochrome P-4502C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries.  
Hypertension. 2000 ; **36**: 270-275.

Fisslthaler B, Popp R, Michaelis UR, Kiss L, Fleming I, Busse R.  
Cyclic stretch enhances the expression and activity of coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase.  
Hypertension. 2001 ; **38** : 1427-1432.

Fisslthaler B, Michaelis UR, Randriamboavonjy V, Busse R, Fleming I.  
Cytochrome P450 epoxygenases and vascular tone : novel role for HMG-CoA reductase inhibitors in the regulation of CYP2C expression.  
Biochem Biophys Acta. 2003 ; **1619** : 332-339.

Fitzpatrick FA, Ennis MD, Baze ME, Wynalda MA, McGee JE, Liggett WF  
Inhibition of cyclooxygenase activity and platelet aggregation by epoxyeicosatrienoic acids. Influence of stereochemistry.  
J Biol Chem. 1986 ; **261** : 15334-15338.

Fleming I.  
Cytochrome P450 enzymes in vascular homeostasis.  
Circ Res. 2001 ; **89** : 753-762.

Fleming I, Michaelis UR, Brendenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP and Busse R.  
Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally source of reactive oxygen species in coronary arteries.  
Circ Res. 2001 ; **88** : 44-51.

Fleming I, Schermer B, Popp R, Busse R.  
Inhibition of the production of endothelium-derived hyperpolarizing factor by cannabinoid receptor agonists.  
Br J Pharmacol. 1999 ; **126** : 949-960.

Flore R, Santoliquido A, Antonio DL, Pola E, Flex A, Pola R, Muzi MG, Farinon A, Rulli F, Gaetani E, Tondi P, Gerardino L, Gasbarrini A. Long saphenous vein stripping reduces local level of reactive oxygen metabolites in patients with varicose disease of the lower limbs.  
World J Surg. 2003 ; **27**: 473-475.

Forman BM, Tzamelis I, Choi HS, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RM, Moore DD.  
Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta.

Nature. 1998 ; 395 : 612-615.

Freeman BD, Zehnbauser BA, McGrath S, Borecki I, Buchman TG.  
Cytochrome P450 polymorphisms are associated with reduced warfarin dose.  
Surgery. 2000 ; **128** : 281-285

Frisbee JC, Roman RJ, Falck JR, Linderman JR, Lombard JH.  
Impairment of flow-induced dilation of skeletal muscle arterioles with elevated oxygen in normotensive and hypertensive rats.  
Microvasc Res. 2000 ; **60** : 37-48.

Frye RF, Schneider VM, Frye CS, Feldman AM.  
Plasma levels of TNF-alpha and IL-6 are inversely related to cytochrome P450-dependent drug metabolism in patients with congestive heart failure.  
J Card Fail. 2002 ; **8** : 315-319.

Fukao M, Mason HS, Kenyon JL, Horowitz B, and Keef KD.  
Regulation of BK(Ca) channels expressed in human embryonic kidney 293 cells by epoxyeicosatrienoic acid.  
Mol Pharmacol. 2001 ; **59** : 16-23.

Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Watanabe H, Shiseki K, Saeki M, Nakamura T, Kurose K, Sai K, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Hanai S, Nakajima T, Matsumoto K, Saito H, Goto Y, Kimura H, Katoh M, Sugai K, Minami N, Shirao K, Tamura T, Yamamoto N, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Kitamura Y, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J.  
Haplotypes of CYP3A4 and their close linkage with CYP3A5 haplotypes in a Japanese population.  
Hum Mutat. 2004 ; **23** : 100.

Furchgott RF and Vanhoutte PM  
Endothelium-derived relaxing and contracting factors.  
FASEB J. 1989 ; **3** : 2007-20018

Furuya H, Meyer UA, Gelboin HV, Gonzalez FJ.  
Polymerase chain reaction-directed identification, cloning, and quantification of human CYP2C18 mRNA.  
Mol Pharmacol. 1991 ; **40** : 375-382.

Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM, Ivan E.  
Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling.  
Circ Res. 2002 ; **91** : 852-859.

Gannon M, Gilday D, Rifkind AB.  
TCDD induces CYP1A4 and CYP1A5 in chick liver and kidney and only CYP1A4, an enzyme lacking arachidonic acid epoxygenase activity, in myocardium and vascular endothelium.  
Toxicol Appl Pharmacol. 2000 ; **164** : 24-37.

Gebremedhin D, Lange AR, Narayanan J, Aebly MR, Jacobs ER, Harder DR.  
Cat cerebral arterial smooth muscle cells express cytochrome P450 4A2 enzyme and produce the vasoconstrictor 20-HETE which enhances L-type Ca<sup>2+</sup> current.  
J Physiol. 1998 ; **507** : 771-781.

Gebremedhin D, Lange AR, Lowry TF, Taheri MR, Birks EK, Hudetz AG, Narayanan J, Falck JR, Okamoto H, Roman RJ, Nithipatikom K, Campbell WB, Harder DR.

Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow.  
*Circ Res.* 2000 ; **87** : 60-65.

Ged C, Umbenhauer DR, Bellew TM, Bork RW, Srivastava PK, Shinriki N, Lloyd RS, Guengerich FP.

Characterization of cDNAs, mRNAs, and proteins related to human liver microsomal cytochrome P-450 (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase.

*Biochemistry.* 1988 ; **27** : 6929-6940.

Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Daujat M, Waechter F, Fabre JM, Carrere N, Maurel P.

Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture.

*Drug Metab Dispos.* 2001 ; **29** : 242-251.

Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ, Maurel P.

Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor.

*J Biol Chem.* 2002 ; **277** : 209-217.

Germer S, Holland MJ, Higuchi R.

High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR.

*Genome Res.* 2000 ; **10** : 258-266.

Givens RC, Lin YS, Dowling AL, Thummel KE, Lamba JK, Schuetz EG, Stewart PW, Watkins PB.

CYP3A5 genotype predicts renal CYP3A activity and blood pressure in healthy adults.

*J Appl Physiol.* 2003 ; **95** : 1297-1300.

Goldstein JA, de Morais SM.

Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily.

*Pharmacogenetics.* 1994 ; **4** : 285-299.

Goldstein JA.

Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily.

*Br J Clin Pharmacol.* 2001 ; **52** : 349-355.

Goldstein JA.

CYP2C9 polymorphisms and CYP2C9\*2 genotyping primers.

*Br J Clin Pharmacol.* 2002 ; **53** : 409-410.

Gomez-Lechon MJ, Donato T, Jover R, Rodriguez C, Ponsoda X, Glaise D, Castell JV, Guguen-Guillouzo C.

Expression and induction of a large set of drug-metabolizing enzymes by the highly differentiated human hepatoma cell line BC2.

*Eur J Biochem.* 2001 ; **268** : 1448-1459.

Gonzalez MA, Selwyn AP

Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease.

*Am. J. Med.,* 2003, **115** : 99S-106S.

Goodwin B, Moore LB, Stoltz CM, McKee DD, Kliewer SA.

Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor.

*Mol Pharmacol.* 2001 ; **60** : 427-431.

- Goodwin B, Hodgson E, D'Costa DJ, Robertson GR, Liddle C.  
Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor.  
*Mol Pharmacol.* 2002 ; **62** : 359-365.
- Graier WF, Hoebel BG, Frank S, and Kostner GM.  
Intracellular action of epoxyeicosatrienoic acids in endothelial cells. In: *Endothelium-Dependent Hyperpolarizing Factors*.  
Edited by Vanhoutte PM. Amsterdam: Harwood, 1999, p. 61-67.
- Granberg L, Ostergren A, Brandt I, Brittebo EB.  
CYP1A1 and CYP1B1 in blood-brain interfaces: CYP1A1-dependent bioactivation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in endothelial cells.  
*Drug Metab Dispos.* 2003 ; **31** : 259-265.
- Guengerich FP  
Human cytochrome P450 enzymes.  
In Ortiz de Montanello PR, ed. *Cytochrome P450 : structure, Mechanisms, and Biochemistry*. New York, NY : Plenum Press ; 1995 : 473-535.
- Guijarro C, Blanco-Colio LM, Massy ZA, O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF, Egido J.  
Lipophilic statins induce apoptosis of human vascular smooth muscle cells.  
*Kidney Int Suppl.* 1999 ; **71** : S88-S91.
- Guo GL, Staudinger J, Ogura K, Klaassen CD.  
Induction of rat organic anion transporting polypeptide 2 by pregnenolone-16alpha-carbonitrile is via interaction with pregnane X receptor.  
*Mol Pharmacol.* 2002 ; **61** : 832-839.
- Hanna IH, Dawling S, Roodi N, Guengerich FP, Parl FF.  
Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity.  
*Cancer Res.* 2000 ; **60** : 3440-3444.
- Hashizume T, Imaoka S, Mise M, Terauchi Y, Fujii T, Miyazaki H, Kamataki T, Funae Y.  
Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes.  
*J Pharmacol Exp Ther.* 2002 ; **300** : 298-304.
- Hasler JA.  
Pharmacogenetics of cytochromes P450.  
*Mol Aspects Med.* 1999 ; **20** : 25-137.
- Harder DR, Gebremedhin D, Narayanan J, Jefcoat C, Falck JR, Campbell WB, and Roman RJ.  
Formation and action of a P-450 4A metabolite of arachidonic acid in cat cerebral microvessels.  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994 ; **266** : H2098-H2107.
- Harder DR, Campbell WB, Roman RJ.  
Role of cytochrome P450 enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone.  
*J. Vasc. Res.* 1995 ; **32** : 79-92.
- Harder DR, Narayanan J, Birks E, Liard JF, Imig JD, Lombard JL, Lange AR, and Roman RJ.  
Identification of a putative oxygen sensor.  
*Circ Res.* 1996 ; **79** : 54-61.
- Harder DR, Lange AR, Gebremedhin D, Briks EK and Roman RJ

Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid as intracellular signaling molecules in vascular tissue.

J. Vasc. Res. 1997; **34** : 237-243.

Harder DR, Roman RJ, Gebremedhin D, Birks EK, and Lange AR.

A common pathway for regulation of nutritive blood flow to the brain: arterial muscle membrane potential and cytochrome P-450 metabolites.

Acta Physiol Scand. 1998 ; **164** : 527-532.

Hasler JA.

Pharmacogenetics of cytochromes P450.

Mol Aspects Med. 1999 ; **20** : 12-24, 25-137.

Hasunuma K, Terano T, Tamura Y, and Yoshida S.

Formation of epoxyeicosatrienoic acids from arachidonic acid by cultured rat aortic smooth muscle cell microsomes.

Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids. 1991 ; **42** : 171-175.

Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S.

Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells.

J Clin Invest. 1998 ; **101** : 2711-2719.

Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Soria E, Lamas S.

Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells.

Circ Res. 2000 ; **87** : 616-622.

Himmelstein BP, Koch CJ.

Studies of type IV collagenase regulation by hypoxia.

Cancer Lett. 1998 ; **124** : 127-133.

Ho PC, Saville DJ, Wanwimolruk S.

Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds.

J Pharm Pharm Sci. 2001 ; **4** : 217-227.

Hodek P, Trefil P, Stiborova M.

Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450.

Chem Biol Interact. 2002 ; **139** : 1-21.

Hoebel BG, Steyrer E, and Graier WF.

Origin and function of epoxyeicosatrienoic acids in vascular endothelial cells: more than just endothelium-derived hyperpolarizing factor?

Clin Exp Pharmacol Physiol. 1998 ; **25** : 826-830.

Holla VR, Adas F, Imig JD, Zhao X, Price E Jr, Olsen N, Kovacs WJ, Magnuson MA, Keeney DS, Breyer MD, Falck JR, Waterman MR, Capdevila JH.

Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp 4a monooxygenases cause hypertension.

Proc Natl Acad Sci USA 2001 ; **98** : 5211-5216.

Howard LA, Miksys S, Hoffmann E, Mash D, Tyndale RF.

Brain CYP2E1 is induced by nicotine and ethanol in rat and is higher in smokers and alcoholics.

Br J Pharmacol. 2003 ; **138** : 1376-1386.

Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, Lai ML, Lin MS, Siest JP, Huang JD.

Novel mutations of CYP3A4 in Chinese.

Drug Metab Dispos. 2001 ; **29** : 268-273.

Hu Y, Oscarson M, Johansson I, Yue QY, Dahl ML, Tabone M, Arinco S, Albano E, Ingelman-Sundberg M.

Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles.

Mol Pharmacol. 1997 ; **51** : 370-376.

Hu Y, Hakkola J, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M.

Structural and functional characterization of the 5'-flanking region of the rat and human cytochrome P450 2E1 genes: identification of a polymorphic repeat in the human gene.

Biochem Biophys Res Commun. 1999 ; **263** : 286-293.

Huang W, Zhang J, Chua SS, Qatanani M, Han Y, Granata R, Moore DD.

Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR).

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 ; **100** : 4156-4161.

Hukkanen J, Hakkola J, Anttila S, Piipari R, Karjalainen A, Pelkonen O, Raunio H.

Detection of mRNA encoding xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human bronchoalveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes.

Mol Carcinog. 1997 ; **20** : 224-230.

Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J, Raunio H.

Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung.

Crit Rev Toxicol. 2002 ; **32** : 391-411.

Hukkanen J, Vaisanen T, Lassila A, Piipari R, Anttila S, Pelkonen O, Raunio H, Hakkola J.

Regulation of CYP3A5 by glucocorticoids and cigarette smoke in human lung-derived cells.

J Pharmacol Exp Ther. 2003 ; **304** : 745-752.

Ibeanu GC, Blaisdell J, Ghanayem BI, Beyeler C, Benhamou S, Bouchardy C, Wilkinson GR, Dayer P, Daly AK, Goldstein JA.

An additional defective allele, CYP2C19\*5, contributes to the S-mephenytoin poor metabolizer phenotype in Caucasians.

Pharmacogenetics. 1998 (a) ; **8** : 129-135.

Ibeanu GC, Goldstein JA, Meyer U, Benhamou S, Bouchardy C, Dayer P, Ghanayem BI, Blaisdell J.

Identification of new human CYP2C19 alleles (CYP2C19\*6 and CYP2C19\*2B) in a Caucasian poor metabolizer of mephenytoin.

J Pharmacol Exp Ther. 1998(b) ; **286** : 1490-1495.

Ibeanu GC, Blaisdell J, Ferguson RJ, Ghanayem BI, Brosen K, Benhamou S, Bouchardy C, Wilkinson GR, Dayer P, Goldstein JA.

A novel transversion in the intron 5 donor splice junction of CYP2C19 and a sequence polymorphism in exon 3 contribute to the poor metabolizer phenotype for the anticonvulsant drug S-mephenytoin.

J Pharmacol Exp Ther. 1999 ; **290** : 635-640.

Imai J, Ieiri I, Mamiya K, Miyahara S, Furuumi H, Nanba E, Yamane M, Fukumaki Y, Ninomiya H, Tashiro N, Otsubo K, Higuchi S.

Polymorphism of the cytochrome P450 (CYP) 2C9 gene in Japanese epileptic patients: genetic analysis of the CYP2C9 locus.

Pharmacogenetics. 2000 ; **10** : 85-89.



- Imig JD, Zou AP, Stec DE, Harder DR, Falck JR, Roman RJ.  
Formation and actions of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in rat renal arterioles.  
*Am J Physiol.* 1996 ; **270** : R217-R227.
- Imig, JD, Kitiyakara C, and Wilcox CS.  
Arachidonate metabolites. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*.  
Edited by Seldin DE, and Giebish G. New York: Lippincott Williams & Wilkens, 2000, p. 875-889.
- Inoue K, Yamazaki H, Shimada T  
Linkage between the distribution of mutations in the CYP2C18 and 2C19 genes in the Japanese and Caucasian.  
*Xenobiotica.* 1998 ; **28** : 403-411.
- Issemann I, Green S.  
Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators.  
*Nature.* 1990 ; **347** : 645-650.
- Itoh S, Yanagimoto T, Tagawa S, Hashimoto H, Kitamura R, Nakajima Y, Okochi T, Fujimoto S, Uchino J, Kamataki T.  
Genomic organization of human fetal specific P-450III<sub>A7</sub> (cytochrome P-450HFL<sub>A</sub>)-related gene(s) and interaction of transcriptional regulatory factor with its DNA element in the 5' flanking region.  
*Biochim Biophys Acta.* 1992 ; **1130** : 133-138.
- Iwai N, Katsuya T, Ishikawa K, Mannami T, Ogata J, Higaki J, Ogihara T, Tanabe T, Baba S.  
Human prostacyclin synthase gene and hypertension : the Suita Study.  
*Circulation.* 1999 ; **100** : 2231-2236.
- Iwano S, Saito T, Takahashi Y, Fujita K, Kamataki T  
Cooperative regulation of CYP3A5 gene transcription by NF- $\kappa$ B and Sp family members.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001 ; **286** : 55-60.
- Ji JY, Jing H, Diamond SL.  
Shear stress causes nuclear localization of endothelial glucocorticoid receptor and expression from the GRE promoter.  
*Circ Res.* 2003 ; **92** : 279-85.
- Jiang M, Mezentsev A, Kemp R, Byun K, Falck JR, Miano JM, Nasjletti A, Abraham NG, Laniado-Schwartzman M.  
Smooth muscle--specific expression of CYP4A1 induces endothelial sprouting in renal arterial microvessels.  
*Circ Res.* 2004 ; **94** : 167-174
- Johnson EF, Hsu MH, Savas U, Griffin KJ.  
Regulation of P450 4A expression by peroxisome proliferator activated receptors.  
*Toxicology.* 2002 ; **181-182** : 203-206.
- Jones, D. A.; Carlton, D. P.; McIntyre, T. M.; Zimmerman, G. A.; Prescott, S. M.  
Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines.  
*J. Biol. Chem.* 1993 ; **268** : 9049-9054.
- Jounaidi Y, Hyraille V, Gervot L, Maurel P.  
Detection of CYP3A5 allelic variant: a candidate for the polymorphic expression of the protein?  
*Biochem Biophys Res Commun.* 1996 ; **221** : 466-470.

- Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ, Castell JV.  
Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved.  
FASEB J. 2002 ; **16** : 1799-1801
- Jurgens G, Lange KH, Reuther LO, Rasmussen BB, Brosen K, Christensen HR.  
Effect of growth hormone on hepatic cytochrome P450 activity in healthy elderly men.  
Clin Pharmacol Ther. 2002 ; **71** : 162-168.
- Kagawa and Waterman.  
Regulation of steroidogenic and related P450s in cytochrome P450 : structure, mechanism and biochemistry.  
In P. Ortiz de Montellano (Ed), 2<sup>nd</sup> edition, Plenum Publishing, New York, pp 419-442.
- Kakiuchi-Matsumoto T, Isashiki Y, Ohba N, Kimura K, Sonoda S, Unoki K.  
Cytochrome P450 1B1 gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma(1).  
Am J Ophthalmol. 2001 ; **131** : 345-350.
- Kaminsky LS, de Morais SM, Faletto MB, Dunbar DA, Goldstein JA.  
Correlation of human cytochrome P4502C substrate specificities with primary structure: warfarin as a probe.  
Mol Pharmacol. 1993 ; **43** : 234-239.
- Kang IH, Kim HJ, Oh H, Park YI, Dong MS.  
Biphasic effects of the flavonoids quercetin and naringenin on the metabolic activation of 2-amino-3,5-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline by Salmonella typhimurium TA1538 co-expressing human cytochrome P450 1A2, NADPH-cytochrome P450 reductase, and cytochrome b5.  
Mutat Res. 2004 ; **545** : 37-47.
- Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA.  
Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor.  
J Biol Chem. 2002 ; **277** : 2908-2915.
- Katoh, T, Takahashi K, DeBoer DK, Serhan CN, and Badr KF.  
Renal hemodynamic actions of lipoxins in rats: a comparative physiological study.  
Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol. 1992 ; **263** : F436-F442.
- Kawai Y, Hayashi T, Eguchi K, Asazuma K, Masamura K, Iwamuro A, Takano Y, Tada H, Matsukawa S, Miyamori I.  
Effects of brief glucocorticoid exposure on growth of vascular smooth muscle cells in culture.  
Biochem Biophys Res Commun. 1998 ; **245** : 493-496.
- Kawashima H, Kununose E, Kubota I, Maekawa M and Kununose M  
Purification and NH2-terminal amino acid sequences of human and rat kidney fatty acid omega-hydroxylases  
Biochim. Biophys. Acta. 1992 ; **1123** : 156-162.
- Kawashima H, Kununose E, Kikuta Y, Kinoshita H, Tanaka S, Yamamoto S, Kishimoto T and Kununose M  
Purification and cDNA cloning of human liver CYP4A fatty acid omega-hydroxylase.  
J. Biochem. 1994 ; **116** : 74-80.
- Kellendonk C, Tronche F, Reichardt HM, Schutz G.

- Mutagenesis of the glucocorticoid receptor in mice.  
*J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999 ; **69** : 253-259.
- Kessler P, Popp R, Busse R, Schini-Kerth VB  
 Proinflammatory mediators chronically downregulate the formation of the endothelium-derived hyperpolarizing factor in arteries via a nitric oxide/cyclic GMP-dependent mechanism  
*Circulation.* 1999 ; **99** : 1878-1884.
- Kestin M, Clifton P, Belling GB, Nestel PJ.  
 n-3 fatty acids of marine origin lower systolic blood pressure and triglycerides but raise LDL cholesterol compared with n-3 and n-6 fatty acids from plants.  
*Am J Clin Nutr.* 1990 ; **51** : 1028-1034.
- Kidd RS, Curry TB, Gallagher S, Edeki T, Blaisdell J, Goldstein JA.  
 Identification of a null allele of CYP2C9 in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin.  
*Pharmacogenetics.* 2001 ; **11** : 803-808.
- Kikuta Y, Kusunose E, Endo K, Yamamoto S, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, Kusunose M.  
 A novel form of cytochrome P-450 family 4 in human polymorphonuclear leukocytes. CDNA cloning and expression of leukotriene B4 omega-hydroxylase.  
*J Biol Chem.* 1993 ; **268** : 9376-9380.
- Kikuta Y, Kusunose E, Kusunose M  
 Purification and characterisation of recombinant rat hepatic CYP4F1.  
*Arch. Biochem. Biophys.* 1999, **369**, 193-196.
- Kimura S, Pastewka J, Gelboin HV, Gonzalez FJ.  
 cDNA and amino acid sequences of two members of the human P450IIC gene subfamily.  
*Nucleic Acids Res.* 1987 ; **15** : 10053-10054.
- King LM, Ma J, Srettabunjong S, Graves J, Bradbury JA, Li L, Spiecker M, Liao JK, Mohrenweiser H, Zeldin DC.  
 Cloning of CYP2J2 gene and identification of functional polymorphisms.  
*Mol Pharmacol.* 2002 ; **61** : 840-852.
- Kiss I, Sandor J, Pajkos G, Bogner B, Hegedus G and Ember I  
 Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2<sup>E</sup>1 and glutathione-S-transferase M1 enzymes.  
*Anticancer Res.* 2000 ; **20** : 519-522.
- Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH, Perlmann T, Lehmann JM.  
 An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway.  
*Cell.* 1998 ; **92** : 73-82.
- Klose TS, Blaisdell JA and Goldstein JA  
 Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2C  
*J. Biochem. Molecular Toxicology.* 1999 ; **13** : 289-295.
- Kocarek TA, Schuetz EG, Strom SC, Fisher RA and Guzelian PS.  
 Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes.  
*Drug Metab Dispos* 1995 ; **23** : 415-421.

- Kocarek TA and Reddy AB.  
Regulation of cytochrome P450 expression by inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase in primary cultured rat hepatocytes and in rat liver.  
Drug Metab Dispos. 1996 ; **24** : 1197-1204.
- Kocarek TA, Dahn MS, Cai H, Strom SC, Mercer-Haines NA.  
Regulation of CYP2B6 and CYP3A expression by hydroxymethylglutaryl coenzyme A inhibitors in primary cultured human hepatocytes.  
Drug. Metab. Dispos. 2002 ; **30** : 1400-1405.
- Kockx MM, Knaapen MW, Bortier HE, Cromheeke KM, Bouterin-Falson O, Finet M.  
Vascular remodeling in varicose veins.  
Angiology. 1998 ; **49** : 871-877.
- Koenig W, Wanner C.  
C-reactive protein and coronary artery disease-what is the link?  
Nephrol Dial Transplant. 1999 ; **14** : 2798-2800.
- Kolpakov V, Rekhter MD, Gordon D, Wang WH, Kulik TJ.  
Effect of mechanical forces on growth and matrix protein synthesis in the in vitro pulmonary artery. Analysis of the role of individual cell types.  
Circ Res. 1995 ; **77** : 823-831.
- Komai K, Sumida K, Kaneko H, Nakatsuka I.  
Identification of a new non-functional CYP2C18 allele in Japanese: substitution of T204 to A in exon2 generates a premature stop codon.  
Pharmacogenetics. 1996 ; **6** : 117-119.
- Komhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nusing RM.  
Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function.  
Am J Physiol. 1997 ; **272** : F460-F468.
- Koop DR, Tierney DJ.  
Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1.  
Bioessays. 1990 ; **12** : 429-435.
- Koop DR, Laethem CL.  
Inhibition of rabbit microsomal cytochrome P-450 2E1-dependent p-nitrophenol hydroxylation by substituted benzene derivatives.  
Drug Metab Dispos. 1992 ; **20** : 775-777.
- Komori M, Nishio K, Ohi H, Kitada M, Kamataki T.  
Molecular cloning and sequence analysis of cDNA containing the entire coding region for human fetal liver cytochrome P-450.  
J Biochem (Tokyo). 1989 ; **105** : 161-163.
- Komori M, Nishio K, Kitada M, Shiramatsu K, Muroya K, Soma M, Nagashima K, Kamataki T.  
Fetus-specific expression of a form of cytochrome P-450 in human livers.  
Biochemistry. 1990 ; **29** : 4430-4433.
- Korenaga R, Ando J, Kosaki K, Isshiki M, Takada Y, Kamiya A.  
Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells.

Am J Physiol. 1997 ; **273** : C1506-C1515.

Kristensen VN, Borresen-Dale AL.

Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism.

Mutat Res. 2000 ; **462** : 323-333.

Krusekopf S, Roots I, Kleeberg U.

Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43.

Eur J Pharmacol. 2003 ; **466** : 7-12.

Kubota T, Hibi N, Chiba K

Linkage of mutant alleles of CYP2C18 and 2C19 in a Japanese population.

Biochem. Pharmacol. 1998 ; **55** : 2039-2042.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan, R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E.

Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression.

Nat Genet. 2001 ; **27** : 383-391.

Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, Nyysönen K, Tuomainen TP, Salonen R, Rauramaa R, Salonen JT.

Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study.

Eur J Endocrinol. 2003 ; **149** : 601-608.

Lacut K, Oger E, Le Gal G, Blouch MT, Abgrall JF, Kerlan V, Scarabin PY, Mottier D; SARAH Investigators.

Differential effects of oral and transdermal postmenopausal estrogen replacement therapies on C-reactive protein.

Thromb Haemost. 2003 ; **90** : 124-131.

Laemmli, UK.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4.

Nature. 1970 ; **227** : 680-685.

Laethem RM and Koop DR

Identification of rabbit cytochromes P450 2C1 and 2C2 as arachidonic acid epoxygenases

Mol. Pharmacol. 1992 ; **42** : 958-963.

Laethem RM, Balazy M, Falck JR, Laethem CL, Koop DR.

Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1.

J Biol Chem. 1993 ; **268** : 12912-12918.

Laine K, Yasar U, Widen J, Tybring G.

A screening study on the liability of eight different female sex steroids to inhibit CYP2C9, 2C19 and 3A4 activities in human liver microsomes.

Pharmacol Toxicol. 2003 ; **93** : 77-81.

Lamba JK, Lin YS, Thummel K, Daly A, Watkins PB, Strom S, Zhang J, Schuetz EG.

Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations.

Pharmacogenetics. 2002 ; **12** : 121-132.

- Lamontagne D, Pohl U, Busse R  
Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed.  
*Circ Res* 1992 ; **70** : 123-130
- Lapple F, von Richter O, Fromm MF, Richter T, Thon KP, Wisser H, Griese EU, Eichelbaum M, Kivisto KT.  
Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver.  
*Pharmacogenetics*. 2003 ;**13** : 565-75.
- Lasker JM, Chen WB, Wolf I, Bloswick BP, Wilson PD and Powell PK  
Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney  
*J. Biol. Chem.* 2000 ; **275** : 4118-4126.
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK.  
Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors.  
*Circulation*. 1998 ; **97** : 1129-1135.
- Laws PE, Spark JI, Cowled PA, Fitridge RA.  
The role of statins in vascular disease.  
*Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004 ; **27** : 6-16.
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA.  
The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions.  
*J Clin Invest*. 1998 ; **102** : 1016-1023.
- Levine M, Law EY, Bandiera SM, Chang TK, Bellward GD.  
In vivo cimetidine inhibits hepatic CYP2C6 and CYP2C11 but not CYP1A1 in adult male rats.  
*J Pharmacol Exp Ther*. 1998 ; **284** : 493-499.
- Levine L.  
Statins stimulate arachidonic acid release and prostaglandin I<sub>2</sub> production in rat liver cells.  
*Lipids Health Dis*. 2003 ; **2** : 1.
- Levy BI.  
The mechanical properties of the arterial wall in hypertension.  
*Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996 ; **54** : 39-43.
- Lewis DF.  
Essential requirements for substrate binding affinity and selectivity toward human CYP2 family enzymes.  
*Arch Biochem Biophys*. 2003 ; **409** : 32-44.
- Li PL, and Campbell WB.  
Epoxyeicosatrienoic acids activate K<sup>+</sup> channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein.  
*Circ Res*. 1997 ; **80** : 877-884.
- Lin JHC, Kobari Y, Stemerman MB, and Pritchard KA Jr.  
Human umbilical vein endothelial cells express P-450 2C8 mRNA: cloning of endothelial P-450 epoxigenase.  
*Endothelium*. 1996 ; **4** : 219-229.

- Lind L.  
Circulating markers of inflammation and atherosclerosis.  
*Atherosclerosis*. 2003 ; **169** : 203-214.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ.  
Protein measurement with the Folin phenol reagent.  
*J Biol Chem*. 1951 ; **193** : 265–275.
- Ma, YH, Harder DR, Clark JE, and Roman RJ.  
Effects of 12-HETE on isolated dog renal arcuate arteries.  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1991 ; **261** : H451-H456.
- Mace K, Bowman ED, Vautravers P, Shields PG, Harris CC, Pfeifer AM.  
Characterisation of xenobiotic-metabolising enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues.  
*Eur J Cancer*. 1998 ; **34** : 914-920.
- Madan A, Graham RA, Carroll KM, Mudra DR, Burton LA, Krueger LA, Downey AD, Czerwinski M, Forster J, Ribadeneira MD, Gan LS, LeCluyse EL, Zech K, Robertson P Jr, Koch P, Antonian L, Wagner G, Yu L, Parkinson A.  
Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes.  
*Drug Metab Dispos*. 2003 ; **31** : 421-31.
- Malaplate-Armand C, Ferrari L, Masson C, Siest G, Batt AM.  
Astroglial CYP1B1 up-regulation in inflammatory/oxidative toxic conditions: IL-1beta effect and protection by N-acetylcysteine.  
*Toxicol Lett*. 2003 ; **138** : 243-251.
- Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Jones TH, Channer KS.  
Testosterone as a protective factor against atherosclerosis--immunomodulation and influence upon plaque development and stability.  
*J Endocrinol*. 2003 ; **178** : 373-380.
- Mangiafico RA, Malatino LS, Santonocito M, Spada RS, Benedetto FA.  
Plasma endothelin-1 release in normal and varicose saphenous veins.  
*Angiology*. 1997 ; **48** : 769-774.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM.  
The RXR heterodimers and orphan receptors.  
*Cell*. 1995 ; **83** : 841-850.
- Marden NY, Fiala-Ber E, Xiang SH, Murray M.  
Role of activator protein-1 in the down-regulation of the human CYP2J2 gene in hypoxia.  
*Biochem J*. 2003 ; **373** : 669-680.
- Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old LJ.  
Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 ; **94** : 8093-8098.
- Martin LD, Barnes SD, Wetzel RC.

Acute hypoxia alters eicosanoid production of perfused pulmonary artery endothelial cells in culture. Prostaglandins. 1992 ; **43** : 371-382.

Masatsugu K, Itoh H, Chun TH, Saito T, Yamashita J, Doi K, Inoue M, Sawada N, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Sone M, Yamahara K, Yurugi T, Nakao K.

Shear stress attenuates endothelin and endothelin-converting enzyme expression through oxidative stress.

Regul Pept. 2003 ; **111** : 13-19.

Matsubara S, Yamamoto S, Sogawa K, Yokotani N, Fujii-Kuriyama Y, Haniu M, Shively JE, Gotoh O, Kusunose E, Kusunose M.

cDNA cloning and inducible expression during pregnancy of the mRNA for rabbit pulmonary prostaglandin omega-hydroxylase (cytochrome P-450p-2).

J Biol Chem. 1987 ; **262** : 13366-13371.

Matsumura K, Saito T, Takahashi Y, Ozeki T, Kiyotani K, Fujieda M, Yamazaki H, Kunitoh H, Kamataki T.

Identification of a novel polymorphic enhancer of the human CYP3A4 gene.

Mol Pharmacol. 2004 ; **65** : 326-334.

McFadyen MC, Rooney PH, Melvin WT, Murray GI.

Quantitative analysis of the Ah receptor/cytochrome P450 CYP1B1/CYP1A1 signalling pathway.

Biochem Pharmacol. 2003 ; **65** : 1663-1674.

Meehan RR, Gosden JR, Rout D, Hastie ND, Friedberg T, Adesnik M, Buckland R, van Heyningen V, Fletcher J, Spurr NK, et al.

Human cytochrome P-450 PB-1: a multigene family involved in mephenytoin and steroid oxidations that maps to chromosome 10.

Am J Hum Genet. 1988 ; **42** : 26-37.

Mendall MA, Patel P, Asante M, Ballam L, Morris J, Strachan DP, Camm AJ, Northfield TC.

Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease.

Heart. 1997 ; **78** : 273-277.

Merryman Simpson AEC

The cytochrome P450 4 (CYP4) family

Gen. Pharmacol. 1997 ; **28** : 351-359.

Michaelis UR, Fisslthaler B, Medhora M, Harder D, Fleming I, Busse R.

Cytochrome P450 2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce angiogenesis via cross-talk with the epidermal growth factor receptor (EGFR).

FASEB J. 2003 ; **17** : 770-772.

Michalik L, Desvergne B, Tan NS, Basu-Modak S, Escher P, Rieusset J, Peters JM, Kaya G, Gonzalez FJ, Zakany J, Metzger D, Chambon P, Duboule D, Wahli W.

Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice.

J Cell Biol. 2001 ; **154** : 799-814.

Michiels C, Arnould T, Janssens D, Bajou K, Geron I, Remacle J

Interactions between endothelial cells and smooth muscle cell after their activation by hypoxia. A possible ethiology for venous disease.

Int. Angiol. 1996 ; **15** : 124-130.



- Michiels C, Arnould T, Thibaut-Vercruyssen R, Bouaziz N, Janssen D, Remacle J  
Perfused human saphenous veins for the study of the origin of varicose veins : role of the endothelium and of hypoxia.  
Int. Angiol. 1997 ; **16** : 134-141
- Michiels C, Arnould T and Remacle J  
Endothelial cell responses to hypoxia : initiation of a cascade of cellular interactions  
Biochem. Biophys. Acta. 2000 ; **1497** : 1-10.
- Milroy CM, Scott DJ, Beard JD, Horrocks M, Bradfield JW.  
Histological appearances of the long saphenous vein.  
J Pathol. 1989 ; **159** : 311-316.
- Minamiyama Y, Takemura S, Akiyama T, Imaoka S, Inoue M, Funae Y and Okada S  
Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels.  
FEBS Lett. 1999 ; **452** : 165-169.
- Mistry DK, Garland CJ  
Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery.  
Br J Pharmacol 1998 ; **124** : 1131-1140
- Miyata A, Hara S, Yokoyama C, Inoue H, Ullrich V, Tanabe T.  
Molecular cloning and expression of human prostacyclin synthase.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994 ; **200** : 1728-1734.
- Mizugaki M, Hiratsuka M, Agatsuma Y, Matsubara Y, Fujii K, Kure S, Narisawa K.  
Rapid detection of CYP2C18 genotypes by real-time fluorescence polymerase chain reaction.  
J. Pharm. Pharmacol. 2000 ; **52** : 199-205.
- Mombouli JV, Zeldin D, Scott-Burden T, Holzmann S, Kostner GM, and Graier WF.  
Epoxyeicosatrienoic acids potentiate Ca<sup>2+</sup> signaling in both endothelial and vascular smooth muscle cells. In: Endothelium-Dependent Hyperpolarizing Factors.  
Edited by Vanhoutte PM. Amsterdam: Harwood, 1999, p. 29-37.
- Moncada S, Vane JR.  
Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin.  
Pharmacol Rev. 1978 ; **30** : 293-331.
- Moore JT, Kliewer SA.  
Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions.  
Toxicology. 2000 ; **153** : 1-10.
- Moorthy B, Miller KP, Jiang W, Williams ES, Kondraganti SR, Ramos KS.  
Role of cytochrome P450 1B1 in benzo[a]pyrene bioactivation to DNA-binding metabolites in mouse vascular smooth muscle cells : evidence from <sup>32</sup>P-postlabeling for formation of 3-hydroxybenzo[a]pyrene-3,6-quinone as major proximate genotoxic intermediates.  
J Pharmacol Exp Ther. 2003 ; **305** : 394-401.
- Morgan ET.  
Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how?  
Drug Metab Dispos. 2001 ; **29** : 207-212.
- Morikawa S, Takabe W, Mataka C, Wada Y, Izumi A, Saito Y, Hamakubo T, Kodama T.

Global analysis of RNA expression profile in human vascular cells treated with statins.  
*J Atheroscler Thromb.* 2004 ; **11** : 62-72.

Mosmann T.

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.

*J Immunol Methods.* 1983 ; **65** : 55-63.

Motwani JG, Topol EJ.

Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention.

*Circulation.* 1998 ; **97** : 916-931.

Muntane-Relat J, Ourlin JC, Domergue J, Maurel P.

Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture.

*Hepatology.* 1995 ; **22** : 1143-1153.

Munzenmaier DH, and Harder DR.

Cerebral microvascular endothelial cell tube formation: role of astrocytic epoxyeicosatrienoic acid release.

*Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 ; **278** : H1163-H1167.

Muskhelishvili L, Thompson PA, Kusewitt DF, Wang C, Kadlubar FF.

In situ hybridization and immunohistochemical analysis of cytochrome P450 1B1 expression in human normal tissues.

*J Histochem Cytochem.* 2001 ; **49** : 229-236.

Muthalif MM, Benter IF, Karzoun N, Fatima S, Harper J, Uddin MR, Malik KU.

20-Hydroxyeicosatetraenoic acid mediates calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 ; **95** : 12701-12706.

Murray GI, McFadyen MC, Mitchell RT, Cheung YL, Kerr AC, Melvin WT.

Cytochrome P450 CYP3A in human renal cell cancer.

*Br J Cancer.* 1999 ; **79** : 1836-1842.

Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, Burke MD.

Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1.

*Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001 ; **41** : 297-316.

Muzaffar S, Jeremy JY, Angelini GD, Stuart-Smith K, Shukla N.

Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries.

*Thorax.* 2003 ; **58** : 598-604.

Nadin L, Murray M.

Participation of CYP2C8 in retinoic acid 4-hydroxylation in human hepatic microsomes.

*Biochem Pharmacol.* 1999 ; **58** : 1201-1208.

Nakayama T, Soma M, Rahmutula D, Izumi Y, Kanmatsuse K.

Nonsense mutation of prostacyclin synthase gene in a family.

*Lancet.* 1997 ; **349** : 1887-1888.

Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, et al.  
The P450 gene superfamily: recommended nomenclature.  
DNA. 1987 ; **6** : 1-11.

Nebert DW, Russell DW.  
Clinical importance of the cytochromes P450.  
Lancet. 2002 ; **360** : 1155-1162.

Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB.  
Arachidonic acid metabolism.  
Annu Rev Biochem. 1986 ; **55** : 69-102.

Negre-Aminou P, van Vliet AK, van Erck M, van Thiel GC, van Leeuwen RE, Cohen LH.  
Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types.  
Biochim Biophys Acta. 1997 ; **1345** : 259-68.

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, et al.  
The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature.  
DNA Cell Biol. 1993 ; **12** : 1-51.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T et al.,  
P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature  
Pharmacogenetics, 1996, **6** : 1-42.

Newton CJ, Ran G, Xie YX, Bilko D, Burgoyne CH, Adams I, Abidia A, McCollum PT, Atkin SL.  
Statin-induced apoptosis of vascular endothelial cells is blocked by dexamethasone.  
J Endocrinol. 2002 ; **174** : 7-16.

Newton CJ, Xie YX, Burgoyne CH, Adams I, Atkin SL, Abidia A, McCollum PT.  
Fluvastatin induces apoptosis of vascular endothelial cells: blockade by glucocorticoids. Cardiovasc Surg. 2003 ; **11** : 52-60.

Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivisto KT.  
Pharmacokinetic interactions with rifampicin : clinical relevance.  
Clin Pharmacokinet. 2003 ; **42** : 819-850.

Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM.  
Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000 ; **279** : H459-H465.

Nishimoto IN, Nanaoka T, Sugimura H, Nagura K, Ihara M, Li XJ, Arai T, Hamada GS, Kowalski LP and Tsugane S  
Cytochrome P450 2E1 polymorphism in gastric cancer in Brazil : case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians  
Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2000 ; **9** : 675-680

Niwa T, Shiraga T, Hashimoto T, Kagayama A.  
Effect of nilvadipine, a dihydropyridine calcium antagonist, on cytochrome p450 activities in human hepatic microsomes.  
Biol Pharm Bull. 2004 ; **27** : 415-417.

Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, and Liao JK.  
Anti-inflammatory properties of cytochrome P-450 epoxygenase-derived eicosanoids.  
*Science*. 1999 ; **285** : 1276-1279.

Node K, Ruan XL, Dai J, Yang SX, Graham L, Zeldin DC, Liao JK.  
Activation of Galpha s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids.  
*J Biol Chem*. 2001 ; **276** : 15983-15989.

Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C, Feingold KR.  
Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats.  
*Endocrinology*. 1995 ; **136** : 2143-2149.

Obach RS.  
Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression.  
*J Pharmacol Exp Ther*. 2000 ; **294** : 88-95.

Oliw EH  
Oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450 monooxygenase  
*Proc Lipid Res* 1994 ; **33** : 329-354.

Omata K, Abraham NG, Escalante B, Schwartzman ML.  
Age-related changes in renal cytochrome P-450 arachidonic acid metabolism in spontaneously hypertensive rats.  
*Am J Physiol*. 1992 ; **262** : F8-F16.

Ong CE, Coulter S, Birkett DJ, Bhasker CR, Miners JO.  
The xenobiotic inhibitor profile of cytochrome P450C8.  
*Br J Clin Pharmacol*. 2000 ; **50** : 573-580.

Ono T, Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW, Takase S.  
Monocyte infiltration into venous valves.  
*J Vasc Surg*. 1998 ; **27** : 158-166.

Palmer CN, Hsu MH, Muerhoff AS, Griffin KJ and Johnson EF  
Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha with the retinoid X receptor alpha unmasks a cryptic peroxisome proliferator response element that overlaps an ARP-1-binding site in the CYP4A6 promoter.  
*J Biol Chem*. 1994 ; **269** : 18083-18089.

Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA.  
Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients.  
*Circulation*. 2001 ; **103** : 1752-1758.

Paoletti R, Corsini A, Bellosta S.  
Pharmacological interactions of statins.  
*Atheroscler Suppl*. 2002 ; **3** : 35-40.

Paolini M, Antelli A, Pozzetti L, Spetlova D, Perocco P, Valgimigli L, Pedulli GF, Cantelli-Forti G.  
Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats.

Carcinogenesis. 2001 ; **22** : 1483-1495.

Parmentier JH, Kremers P, Ferrari L, Batt AM, Gielen JE, Siest G.

Repression of cytochrome P450 by cytokines: IL-1 beta counteracts clofibric acid induction of CYP4A in cultured fetal rat hepatocytes.

Cell Biol Toxicol. 1993 ; **9** : 307-313.

Parmentier JH, Schohn H, Bronner M, Ferrari L, Batt AM, Dauca M, Kremers P.

Regulation of CYP4A1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression by interleukin-1beta, interleukin-6, and dexamethasone in cultured fetal rat hepatocytes.

Biochem Pharmacol. 1997 ; **54** : 889-898.

Parmentier JH, Muthalif MM, Nishimoto AT, Malik KU.

20-hydroxyeicosatetraenoic acid mediates angiotensin ii-induced phospholipase d activation in vascular smooth muscle cells.

Hypertension. 2001 ; **37** : 623-629.

Pascussi JM, Jounaidi Y, Drocourt L, Domergue J, Balabaud C, Maurel P, Vilarem MJ. Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A7 promoter gene.

Biochem Biophys Res Commun. 1999 ; **260** : 377-381.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ

Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes : consequences on cytochrome P450 gene regulation.

Mol. Pharmacol., 2000 (a) ; **58** : 1441-1450.

Pascussi JM, Drocourt L, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ.

Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators.

Mol Pharmacol. 2000(b) ; **58** : 361-72.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre JM, Maurel P, 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 (c) ; **274** : 707-713.

Pascussi JM, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ.

Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor.

Eur J Biochem 2001; **268** : 6346-6358.

Pascussi JM, Dvorak Z, Gerbal-Chaloin S, Assenat E, Maurel P, Vilarem MJ. Pathophysiological factors affecting CAR gene expression.

Drug Metab Rev. 2003 ; **35** : 255-268.

**Patki KC, Von Moltke LL, Greenblatt DJ.**

In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5.

Drug Metab Dispos. 2003 ; **31** : 938-944.

Patterson MA, Leville CD, Hower CD, Jean Claude JM, Seabrook GR, Towne JB and Cambria RA

Shear force regulates matrix metalloproteinase activity in human saphenous vein organ culture.

J. Surg. Res. 2001 ; **95** : 67-72

Paulussen A, Lavrijsen K, Bohets H, Hendrickx J, Verhasselt P, Luyten W, Konings F, Armstrong M.

Two linked mutations in transcriptional regulatory elements of the CYP3A5 gene constitute the major genetic determinant of polymorphic activity in humans.  
Pharmacogenetics. 2000 ; **10** : 415-424.

Pearce RE, McIntyre CJ, Madan A, Sanzgiri U, Draper AJ, Bullock PL, Cook DC, Burton LA, Latham J, Nevins C, Parkinson A.  
Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity.  
Arch Biochem Biophys. 1996 ; **331** : 145-169.

Pfister SL, Falck JR, Campbell WB.  
Enhanced synthesis of epoxyeicosatrienoic acids by cholesterol-fed rabbit aorta.  
Am J Physiol. 1991 ; **261**: H843–H852.

Pichard L, Curi-Pedrosa R, Bonfils C, Jacqz-Aigrain E, Domergue J, Joyeux H, Cosme J, Guengerich FP, Maurel P.  
Oxidative metabolism of lansoprazole by human liver cytochromes P450.  
Mol Pharmacol. 1995 ; **47** : 410-418.

Piipari R, Savela K, Nurminen T, Hukkanen J, Raunio H, Hakkola J, Mantyla T, Beaune P, Edwards RJ, Boobis AR and Antilla S  
Expression of CYP1A1, CYP1B and CYP3A and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in bronchoalveolar macrophages of smokers and non-smokers.  
Int. J. Cancer. 2000 ; **86** : 610-616.

Pinaire J, Chou WY, Morton M, You M, Zeng Y, Cho WK, Galli A, Everett L, Breen H, Dumaul N, Smith JR, Crabb D.  
Identification of a retinoid receptor response element in the human aldehyde dehydrogenase-2 promoter.  
Alcohol Clin Exp Res. 2003 ; **27** : 1860-1866.

Pinto A, Abraham NG, Mullane KM.  
Cytochrome P-450-dependent monooxygenase activity and endothelial-dependent relaxations induced by arachidonic acid.  
J Pharmacol Exp Ther. 1986 ; **236** : 445-451.

Piscaglia F, Knittel T, Kobold D, Barnikol-Watanabe S, Di Rocco P, Ramadori G.  
Cellular localization of hepatic cytochrome 1B1 expression and its regulation by aromatic hydrocarbons and inflammatory cytokines.  
Biochem Pharmacol. 1999 ; **58** : 157-165.

Piver B, Berthou F, Dreano Y, Lucas D.  
Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by epsilon-viniferin, the dimer of resveratrol: comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages.  
Life Sci. 2003 ; **73** : 1199-1213.

Poirier J, Chevreau J  
Appareil cardiovasculaire. Vaisseaux lymphatiques. Organes hématopoïétiques et lymphoïdes.  
Appareil respiratoire.  
Paris : Maloine, 1972, 2<sup>ème</sup> édition, 3<sup>ème</sup> fascicule, pp : 7-31.

Pomposiello SI, Carroll MA, Falck JR, McGiff JC.  
Epoxyeicosatrienoic acid-mediated renal vasodilation to arachidonic acid is enhanced in SHR.  
Hypertension. 2001; **37**: 887–893.

- Powell PK, Wolf I, Jin R and Lasker JM  
Metabolism of arachidonic acid to 20-hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid by P450 enzymes in human liver : involvement of CYP4F2 and CYP4A11  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1998 ; **285** :1327-1336.
- Proksch E, Feingold KR, Elias PM.  
Epidermal HMG CoA reductase activity in essential fatty acid deficiency: barrier requirements rather than eicosanoid generation regulate cholesterol synthesis.  
J Invest Dermatol. 1992 ; **99** : 216-220.
- Rae JM, Johnson MD, Lippman ME, Flockhart DA.  
Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays.  
J Pharmacol Exp Ther. 2001 ; **299** : 849-857.
- Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ, Harris JW.  
Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8.  
Cancer Res. 1994 ; **54** : 5543-5546.
- Rahman M, Wright JT and Douglas J  
The role of the cytochrome P450-dependent metabolites of arachidonic acid in blood pressure regulation and renal function  
Am. J. Hypertens. 1997 ; **10** : 356-365.
- Raiteri M, Arnaboldi L, McGeedy P, Gelb MH, Verri D, Tagliabue C, Quarato P, Ferraboschi P, Santaniello E, Paoletti R, Fumagalli R, Corsini A.  
Pharmacological control of the mevalonate pathway: effect on arterial smooth muscle cell proliferation.  
J Pharmacol Exp Ther. 1997 ; **281** : 1144-1153.
- Rashid J, McKinstry C, Renwick AG, Dirnhuber M, Waller DG, George CF.  
Quercetin, an in vitro inhibitor of CYP3A, does not contribute to the interaction between nifedipine and grapefruit juice.  
Br J Clin Pharmacol. 1993 ; **36** : 460-463.
- Ratyck RE, Chuknyiska RS, Bulkley GB.  
The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells.  
Surgery. 1987 ; **44** : 639-646.
- Raucy JL, Mueller L, Duan K, Allen SW, Strom S, Lasker  
Expression and induction of CYP2C P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes.  
J Pharmacol Exp Ther. 2002 ; **302** : 475-482.
- Raunio H, Hakkola J, Hukkanen J, Pelkonen O, Edwards R, Boobis A, Anttila S  
Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human pulmonary tissues.  
Arch. Toxicol. Suppl. 1998 ; **20** : 465-469
- Raunio H, Hakkola J, Hukkanen J, Lassila A, Paivarinta K, Pelkonen O, Anttila S, Piipari R, Boobis A, Edwards RJ.  
Expression of xenobiotic-metabolizing CYPs in human pulmonary tissue.  
Exp Toxicol Pathol. 1999 ; **51** : 412-417.
- Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB.

Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4.  
J Natl Cancer Inst. 1998 ; **90** : 1225-1229.

Reilly DT, Wolfe JH.

ABC of vascular diseases. The swollen leg.

BMJ. 1991 ; **303** : 1462-1465.

Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr.

Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 ; **90** : 4591-4595.

Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, Korzekwa KR.

Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9.

Pharmacogenetics. 1994 ; **4** : 39-42.

Rexrode KM, Pradhan A, Manson JE, Buring JE, Ridker PM

Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and interleukine-6 in women.

Ann. Epidemiol. 2003 ; **13** : 674-682.

Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH.

Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women.

Circulation. 1998 ; **98** : 731-733.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N.

C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women.

N Engl J Med. 2000 ; **342** : 836-843.

Ridker PM, Morrow DA.

C-reactive protein, inflammation, and coronary risk.

Cardiol Clin. 2003 ; **21** : 315-325.

Rifkind AB, Lee C, Chang TKH and Waxman D

Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1 and 1A2 : regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxygenation in human liver microsomes.

Arch. Biochim. Biophys. 1995 ; **320** : 380-389.

Ripp SL, Fitzpatrick JL, Peters JM, Prough RA.

Induction of CYP3A expression by dehydroepiandrosterone: involvement of the pregnane X receptor.

Drug Metab Dispos. 2002 ; **30** : 570-575.

Rise P, Pazzucconi F, Sirtori CR, Galli C.

Statins enhance arachidonic acid synthesis in hypercholesterolemic patients.

Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2001 ; **11** : 88-94.

Robertson P Jr, Hellriegel ET, Arora S, Nelson M.

Effect of modafinil at steady state on the single-dose pharmacokinetic profile of warfarin in healthy volunteers.

J Clin Pharmacol. 2002 ; **42** : 205-214.



- Rocha PN, Plumb TJ, Coffman TM  
Eicosanoids : lipid mediators of inflammation in transplantation.  
Springer Semin Immunopathol. 2003 ; **25** : 215-227.
- Rochat B, Morsman JM, Murray GI, Figg WD, McLeod HL.  
Human CYP1B1 and anticancer agent metabolism: mechanism for tumor-specific drug inactivation?  
J Pharmacol Exp Ther. 2001 ; **296** : 537-541.
- Roman RJ, Maier KG, Sun CW, Harder DR and Alonso-Galicia M  
Renal and cardiovascular actions of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids  
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2000 ; **27** : 855-865.
- Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA, Raucy JL, Goldstein JA.  
Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome  
P450IIC subfamily.  
Biochemistry. 1991 ; **30** : 3247-3255.
- Rosolowsky LJ, Campbell WB.  
Endothelin enhances adrenocorticotropin-stimulated aldosterone release from cultured bovine adrenal  
cells.  
Endocrinology. 1990 ; **126** : 1860-1866.
- Ross R.  
Atherosclerosis is an inflammatory disease.  
Am Heart J. 1999 ; **138** : S419-S420.
- Ruas JL, Lechner MC.  
Allele frequency of CYP2C19 in a Portuguese population.  
Pharmacogenetics. 1997 ; **7** : 333-335.
- Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H.  
Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells:  
antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy.  
Circulation. 2001 ; **104** : 1767-1772.
- Sacks FM, Pfeffer MA, Moyer LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW,  
Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E.  
The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average  
cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators.  
N Engl J Med. 1996 ; **335** : 1001-1009.
- Sahi J, Black CB, Hamilton GA, Zheng X, Jolley S, Rose KA, Gilbert D, LeCluyse EL, Sinz MW.  
Comparative effects of thiazolidinediones on in vitro P450 enzyme induction and inhibition.  
Drug Metab Dispos. 2003 ; **31** : 439-446.
- Saito T, Takahashi Y, Hashimoto H, Kamataki T  
Novel transcriptional regulation of the human CYP3A7 gene by Sp1 and Sp3 through nuclear factor  
kappa b-like element.  
J. Biol. Chem. 2001 ; **276** : 38010-38022.
- Sala A, Zarini S, Bolla M.  
Leukotrienes: lipid bioeffectors of inflammatory reactions.  
Biochemistry (Mosc). 1998 ; **63** : 84-92.

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P  
Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes.  
Proc Natl Acad Sci U S A 1993 ; **90** : 7240-7244.

Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL, Gonzalez FJ.  
CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic  
variant with altered catalytic activity.  
Clin Pharmacol Ther. 2000 ; **67** : 48-56.

Sautebin L, Ialenti A, Ianaro A, Di Rosa M  
Modulation by nitric oxide of prostaglandine biosynthesis in the rat  
Br J Pharmacol. 1995 ; **114** : 323-328.

Scarborough PE, Ma J, Qu W, Zeldin DC.  
P450 subfamily CYP2J and their role in the bioactivation of arachidonic acid in extrahepatic tissues.  
Drug Metab Rev. 1999 ; **31** : 205-234.

Schaub FJ, Han DK, Liles WC, Adams LD, Coats SA, Ramachandran RK, Seifert RA, Schwartz SM,  
Bowen-Pope DF.  
Fas/FADD-mediated activation of a specific program of inflammatory gene expression in vascular  
smooth muscle cells.  
Nat Med. 2000 ; **6** : 790-796.

Schmedje JF, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS  
Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular  
endothelial cells.  
J. Biol. Chem. 1997 ; **272** : 601-608.

Schmucker DL, Woodhouse KW, Wang RK, Wynne H, James OF, McManus M, Kremers P. Effects  
of age and gender on in vitro properties of human liver microsomal monooxygenases. *Clin.  
Pharmacol. Ther.* 1990; **48**: 365-374.

Schuetz EG, Schuetz JD, Strom SC, Thompson MT, Fisher RA, Molowa DT, Li D and Guzelian PS.  
Regulation of human liver cytochromes P450 in family 3A in primary and continuous culture of human  
hepatocytes.  
Hepatology 1993 ; **18** : 1254-1262.

Schuetz JD, Beach DL, Guzelian PS.  
Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver.  
Pharmacogenetics. 1994 ; **4** : 11-20.

Schuetz JD, Schuetz EG, Thottassery JV, Guzelian PS, Strom S, Sun D.  
Identification of a novel dexamethasone responsive enhancer in the human CYP3A5 gene and its  
activation in human and rat liver cells.  
Mol Pharmacol. 1996 ; **49** : 63-72.

Schuller-Petrovic S, Siedler S, Kern T, Meinhart J, Schmidt K, Brunner F.  
Imbalance between the endothelial cell-derived contracting factors prostacyclin and angiotensin II and  
nitric oxide/cyclic GMP in human primary varicosis.  
Br J Pharmacol. 1997 ; **122** : 772-778.

Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH.  
Replication of smooth muscle cells in vascular disease.  
Circ Res. 1986 ; **58** : 427-444.

- Schwartzman ML, Balazy M, Masferrer J, Abraham NG, McGiff JC, Murphy RC.  
12(R)-hydroxyicosatetraenoic acid: a cytochrome-P450-dependent arachidonate metabolite that inhibits Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the cornea.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 ; **84** : 8125-8129.
- Scoumanne A, Kalamati T, Moss J, Powell JT, Gosling M, Carey N.  
Generation and characterisation of human saphenous vein endothelial cell lines.  
Atherosclerosis. 2002 ; **160** : 59-67.
- Scripture CD, Pieper JA.  
Clinical pharmacokinetics of fluvastatin.  
Clin Pharmacokinet. 2001 ; **40** : 263-281.
- Severson AR, Ingram RT, Fitzpatrick LA.  
Matrix proteins associated with bone calcification are present in human vascular smooth muscle cells grown in vitro.  
In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1995 ; **31** : 853-857.
- Shadle CR, Lee Y, Majumdar AK, Petty KJ, Gargano C, Bradstreet TE, Evans JK, Blum RA.  
Evaluation of potential inductive effects of aprepitant on cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity.  
J Clin Pharmacol. 2004 ; **44** : 215-223.
- Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL.  
High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques.  
J Clin Invest. 1994 ; **93** : 2393-2402.
- Sharma K, DOIG MV, Lewis DFV and Gibson GG.  
Role of hepatic and renal cytochrome P450IVA1 in the metabolism of lipids substrates  
Biochem. Pharmacol. 1989 ; **38** : 3621-3629.
- Shepherd J.  
Statin therapy in clinical practice: new developments.  
Curr Opin Lipidol. 1995 ; **6** : 254-255.
- Shimamoto J, Ieiri I, Urae A, Kimura M, Irie S, Kubota T, Chiba K, Ishizaki T, Otsubo K, Higuchi S.  
Lack of differences in diclofenac (a substrate for CYP2C9) pharmacokinetics in healthy volunteers with respect to the single CYP2C9\*3 allele.  
Eur J Clin Pharmacol. 2000 ; **56** : 65-68.
- Siegle I, Klein T, Zou MH, Fritz P, Komhoff M.  
Distribution and cellular localization of prostacyclin synthase in human brain.  
J Histochem Cytochem. 2000 ; **48** : 631-641.
- Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C, Beaud B, Lecomte E, Steinmetz J, Locuty J, Chevrier P.  
Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort.  
Clin Chem Lab Med. 1998 ; **36** : 35-42.
- Signorelli SS, Malaponte MG, Di Pino L, Costa MP, Pennisi G and Mazzarino MC  
Venous stasis causes release of interleukine 1 bete (IL-1 beta), interleukine 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) by monocyte-macrophage.  
Clin. Hemorheol Microcirc. 2000 ; **22** : 311-316.

- Singleton DW, Lei XD, Webb SJ, Prough RA, Geoghegan TE.  
Cytochrome P-450 mRNAs are modulated by dehydroepiandrosterone, nafenopin, and triiodothyronine.  
Drug Metab Dispos. 1999 ; **27** : 193-200.
- Smith WL, Langenbach R.  
Why there are two cyclooxygenase isozymes.  
J Clin Invest. 2001 ; **107** : 1491-1495.
- Song BJ, Gelboin HV, Park SS, Yang CS, Gonzalez FJ.  
Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s.  
Transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme.  
J Biol Chem. 1986 ; **261** : 16689-16697.
- Song BJ, Veech RL, Saenger P.  
Cytochrome P450IIE1 is elevated in lymphocytes from poorly controlled insulin-dependent diabetics.  
J Clin Endocrinol Metab. 1990 ; **71** : 1036-1040.
- Soyama A, Hanioka N, Saito Y, Murayama N, Ando M, Ozawa S, Sawada J.  
Amiodarone N-deethylation by CYP2C8 and its variants, CYP2C8\*3 and CYP2C8 P404A.  
Pharmacol Toxicol. 2002 ; **91** : 174-178.
- Stanford SJ, Pepper JR, Mitchell JA.  
Cyclooxygenase-2 regulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, but not interleukin-8,  
production by human vascular cells: role of cAMP.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 ; **20** : 677-682.
- Stanford SJ, Pepper JR, Burke-Gaffney A, Mitchell JA.  
Cytokine-activated human vascular smooth muscle delays apoptosis of neutrophils: relevance of  
interactions between cyclo-oxygenase-2 and colony-stimulating factors.  
FASEB J. 2001 ; **15** : 1813-1815.
- Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen  
CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH, Kliewer SA.  
The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 ; **98** : 3369-3374.
- Stec DE, Flasch A, Roman RJ, White JA.  
Distribution of cytochrome P-450 4A and 4F isoforms along the nephron in mice.  
Am J Physiol Renal Physiol. 2003 ; **284** : F95-102.
- Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M.  
Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the  
principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus  
on chromosome 2p21.  
Hum Mol Genet. 1997 ; **6** : 641-647.
- Stresser DM, Broudy MI, Ho T, Cargill CE, Blanchard AP, Sharma R, Dandeneau AA, Goodwin JJ,  
Turner SD, Erve JC, Patten CJ, Dehal SS, Crespi CL. Related Articles, Links  
Highly selective inhibition of human CYP3Aa in vitro by azamulin and evidence that inhibition is  
irreversible.  
Drug Metab Dispos. 2004 ; **32** : 105-112.
- Suda K, Rothen-Rutishauser B, Gunthert M, Wunderli-Allenspach H.

Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features.  
*In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2001 ; **37** : 505-514.

Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P, Negishi M.  
The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene.  
*J Biol Chem.* 1999 ; **274** : 6043-6046.

Sugatani J, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, Gong QH, Owens IS, Negishi M, Sueyoshi T.  
The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR.  
*Hepatology.* 2001 ; **33** : 1232-1238.

Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, Miners JO, Birkett DJ, Goldstein JA.  
The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism.  
*Pharmacogenetics.* 1996 ; **6** : 341-349.

Sun CW, Alonso-Galicia M, Taheri MR, Falck JR, Harder DR, Roman RJ.  
Nitric oxide-20-hydroxyeicosatetraenoic acid interaction in the regulation of K<sup>+</sup> channel activity and vascular tone in renal arterioles.  
*Circ Res.* 1998 ; **83** : 1069-1079.

Sun F, Tsuritani I, Honda R, Ma ZY, Yamada Y.  
Association of genetic polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes with excessive alcohol consumption in Japanese men.  
*Hum Genet.* 1999 ; **105** : 295-300.

Suzuki Y, Saito H, Kasanuki J, Kishimoto T, Tamura Y, Yoshida S.  
Significant increase of interleukin 6 production in blood mononuclear leukocytes obtained from patients with active inflammatory bowel disease.  
*Life Sci* 1990 ; **47** : 2193-2197.

Synold TW, Dussault I, Forman BM.  
The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux.  
*Nat Med.* 2001 ; **7** : 584-590

Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, Mukai K, Goto T.  
Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells.  
*In Vitro Cell Dev Biol.* 1990 ; **26** : 265-274.

Takase S, Schmid-Schonbein G, Bergan JJ.  
Leukocyte activation in patients with venous insufficiency.  
*J Vasc Surg.* 1999 ; **30** : 148-156.

Takase S, Bergan JJ, Schmidt-Schonbein G  
Expression of adhesion molecules and cytokines on saphenous veins in chronic venous insufficiency  
*Ann. Vasc. Surg.* 2000 ; **14** : 427-435.

Take S, Mizuno M, Ishiki K, Nagahara Y, Yoshida T, Inaba T, Yamamoto K, Okada H, Yokota K, Oguma K, Shiratori Y.  
Interleukin-1beta genetic polymorphism influences the effect of cytochrome P 2C19 genotype on the cure rate of 1-week triple therapy for *Helicobacter pylori* infection.  
*Am J Gastroenterol.* 2003 ; **98** : 2403-2408.

- Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, de Zeeuw RA, de Leij LF, Jonkman JH.  
The prevalence of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in a population of healthy Dutch volunteers.  
*Eur J Clin Pharmacol* 2001 ; **57** : 717-722.
- Tan FL, Moravec CS, Li J, Apperson-Hansen C, McCarthy PM, Young JB, Bond M.  
The gene expression fingerprint of human heart failure.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 ; **99** : 11387-11392.
- Tanaka F, Shiratori Y, Yokosuka O, Imazeki F, Tsukada Y, Omata M.  
Polymorphism of alcohol-metabolizing genes affects drinking behavior and alcoholic liver disease in Japanese men.  
*Alcohol Clin Exp Res.* 1997 ; **21** : 596-601
- Tang YM, Wo YY, Stewart J, Hawkins AL, Griffin CA, Sutter TR, Greenlee WF.  
Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene.  
*J Biol Chem.* 1996 ; **271** : 28324-28330.
- Tang YM, Green BL, Chen GF, Thompson PA, Lang NP, Shinde A, Lin DX, Tan W, Lyn-Cook BD, Hammons GJ, Kadlubar FF.  
Human CYP1B1 Leu432Val gene polymorphism: ethnic distribution in African-Americans, Caucasians and Chinese; oestradiol hydroxylase activity; and distribution in prostate cancer cases and controls.  
*Pharmacogenetics.* 2000 ; **10** : 761-766.
- Tanner FC, Meier P, Greutert H, Champion C, Nabel EG, Luscher TF  
Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins : a cytostatic strategy for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation.  
*Circulation.* 2000 ; **101** : 1982-1989.
- Terkeltaub R, Solan J, Barry M Jr, Santoro D, Bokoch GM.  
Role of the mevalonate pathway of isoprenoid synthesis in IL-8 generation by activated monocytic cells.  
*J Leukoc Biol.* 1994 ; **55** : 749-755.
- Thum T and Borlak J  
Gene expression in distinct regions of the heart  
*The lancet.* 2000 ; **355** : 979-983.
- Thum T, Borlak J.  
Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced vascular injury. Therapy through LOX-1 receptor antagonism ?  
*Circ Res.* 2004 ; **94** : e1-e13.
- Thyberg J, Palmberg L, Nilsson J, Ksiazek T, Sjolund M.  
Phenotype modulation in primary cultures of arterial smooth muscle cells. On the role of platelet-derived growth factor.  
*Differentiation.* 1983 ; **25** : 156-167.
- Tiidus PM.  
Influence of estrogen on skeletal muscle damage, inflammation, and repair.  
*Exerc Sport Sci Rev.* 2003 ; **31** : 40-44.
- Tozzi CA, Poiani GJ, Harangozo AM, Boyd CD, Riley DJ.

Pressure-induced connective tissue synthesis in pulmonary artery segments is dependent on intact endothelium.

J Clin Invest. 1989 ; **84** : 1005-10012.

Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, Ives DG, Evans RW, Cushman M, Meilahn EN, Kuller LH.  
Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 ; **17** : 1121-1127.

Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Bocuzzi SJ, Cedarholm JC, Alexander RW.

Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease.

N Engl J Med. 1995 ; **332** : 481-487.

Tsao CC, Coulter SJ, Chien A, Luo G, Clayton NP, Maronpot R, Goldstein JA and Zeldin DC

Identification and localization of five CYP2Cs in murine extrahepatic tissues and their metabolism of arachidonic acid to regio and stereoselective products.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001 ; **299** : 39-47.

Tsuneoka Y, Matsuo Y, Okuyama E, Watanabe Y, Ichikawa Y.

Genetic analysis of the cytochrome P-450IIC18 (CYP2C18) gene and a novel member of the CYP2C subfamily.

FEBS Lett. 1996 ; **384** : 281-284.

Tzamelis I, Pissios P, Schuetz EG, Moore DD.

The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR.

Mol Cell Biol. 2000 ; **20** : 2951-2958.

Ueda A, Hamadeh HK, Webb HK, Yamamoto Y, Sueyoshi T, Afshari CA, Lehmann JM, Negishi M.

Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital.

Mol Pharmacol. 2002 ; **61** : 1-6.

Umehara K, Shimokawa Y, Miyamoto G. Related Articles, Links

Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 by buprenorphine.

Biol Pharm Bull. 2002 ; **25** : 682-685.

Usui T, Saitoh Y, Komada F.

Induction of CYP3As in HepG2 cells by several drugs. Association between induction of CYP3A4 and expression of glucocorticoid receptor.

Biol Pharm Bull. 2003 ; **26** : 510-517.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM.

Cyclooxygenases 1 and 2.

Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1998 ; **38** : 97-120.

Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM.

Statins do more than just lower cholesterol.

Lancet. 1996 ; **348** : 1079-1082.

Villard PH, Seree E, Lacarelle B, Therene-Fenoglio MC, Barra Y, Attolini L, Bruguerole B, Durand A, Catalin J. Related Articles, Links

Effect of cigarette smoke on hepatic and pulmonary cytochromes P450 in mouse: evidence for CYP2E1 induction in lung.

Biochem Biophys Res Commun. 1994 ; **202** : 1731-1737.

Vincent L, Soria C, Mirshahi F, Opolon P, Mishal Z, Vannier JP, Soria J, Hong L. Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in in vivo models.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 ; **22** : 623-629.

Voelkel NF, Tuder RM, Wade K, Hoër M, Lepley RA, Goulet JL, Koller BH, Fitzpatrick F  
Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) reduces pulmonary vascular reactivity and pulmonary hypertension in hypoxic rats.

J. Clin. Invest. 1996 ; **97** : 2491-2498.

Wandel C, Witte JS, Hall JM, Stein CM, Wood AJ, Wilkinson GR.

CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4\*1B5'-promoter region polymorphism.

Clin Pharmacol Ther. 2000 ; **68** : 82-91.

Watkins PB.

The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel.

Adv Drug Deliv Rev. 1997 ; **27** : 161-170.

Wang MH, Stec DE, Balazy M, Mastuyugin V, Yang CS, Roman RJ, Schwartzman ML.

Cloning, sequencing, and cDNA-directed expression of the rat renal CYP4A2: arachidonic acid omega-hydroxylation and 11,12-epoxidation by CYP4A2 protein.

Arch Biochem Biophys. 1996 ; **336** : 240-250.

Wang SL, Lee H, Chen KW, Tsai KJ, Chen CY and Lin P

Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a taiwanese population

Lung cancer. 1999 ; **26** : 27-34

Wang MH, Zhang F, Marji J, Zand BA, Nasjletti A, Laniado-Schwartzman M.

CYP4A1 antisense oligonucleotide reduces mesenteric vascular reactivity and blood pressure in SHR.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001 ; **280** : R255-R261.

Wang JS, Neuvonen M, Wen X, Backman JT, Neuvonen PJ.

Gemfibrozil inhibits CYP2C8-mediated cerivastatin metabolism in human liver microsomes.

Drug Metab Dispos. 2002 (a) ; **30** : 1352-1356.

Wang JF, Yang Y, Sullivan MF, Min J, Cai J, Zeldin DC, Xiao YF, Morgan JP.

Induction of cardiac cytochrome p450 in cocaine-treated mice.

Exp Biol Med (Maywood). 2002 (b) ; **227** : 182-188.

Wang XL, Greco M, Sim AS, Duarte N, Wang J, Wilcken DE.

Effect of CYP1A1 MspI polymorphism on cigarette smoking related coronary artery disease and diabetes.

Atherosclerosis. 2002 (c) ; **162** : 391-397.

Wang MH, Smith A, Zhou Y, Chang HH, Lin S, Zhao X, Imig JD, Dorrance AM.

Downregulation of renal CYP-derived eicosanoid synthesis in rats with diet-induced hypertension.

Hypertension. 2003 (a) ; **42** : 594-599.



- Wang XL, Raveendran M, Wang J.  
Genetic influence on cigarette-induced cardiovascular disease.  
Prog Cardiovasc Dis. 2003 (b) ; **45** : 361-382.
- Warren GW, van Ess PJ, Watson AM, Mattson MP, Blouin RA.  
Cytochrome P450 and antioxidant activity in interleukin-6 knockout mice after induction of the acute-phase response.  
J Interferon Cytokine Res. 2001 ; **21** : 821-826.
- Waxman DJ.  
P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR.  
Arch Biochem Biophys. 1999 ; **369** : 11-23.
- Weksler BB, Eldor A, Falcone D, Levin RI, Jaffe EA and Minick CR.  
(1982) in cardiovascular pharmacology of prostaglandins.  
(Herman, AG, Vanhoutte PM, Denolin H and Goossens A, eds) pp137-148, Raven Press, New York.
- Wen X, Wang JS, Backman JT, Laitila J, Neuvonen PJ.  
Trimethoprim and sulfamethoxazole are selective inhibitors of CYP2C8 and CYP2C9, respectively.  
Drug Metab Dispos. 2002 ; **30** : 631-635.
- Westlind A, Lofberg L, Tindberg N, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M.  
Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region.  
Biochem Biophys Res Commun. 1999 ; **259** : 201-205.
- Willey JC, Coy EL, Frampton MW, Torres A, Apostolakos MJ, Hoehn G, Schuermann WH, Thilly WG, Olson DE, Hammersley JR, Crespi CL, Utell MJ.  
Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers.  
Am J Respir Cell Mol Biol. 1997 ; **17** : 114-124.
- Wong NA, Rae F, Simpson KJ, Murray GD, Harrison DJ.  
Genetic polymorphisms of cytochrome p4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis.  
Mol Pathol. 2000 ; **53** : 88-93.
- Woods M, Bishop-Bailey D, Pepper JR, Evans TW, Mitchell JA, Warner TD  
Cytokine and lipopolysaccharide stimulation of endothelin-1 release from human internal mammary artery and saphenous vein smooth-muscle cells  
J.Cardiovasc. Pharmacol. 1998 ; **31** : S348-350
- Woods M, Mitchell JA, Wood EG, Barker S, Walcot NR, Rees GM, Warner TD  
Endothelin-1 is induced by cytokines in human vascular smooth muscle cells : evidence for intracellular endothelin-converting enzyme.  
Mol. Pharmacol. 1999; **55** : 902-909.
- Woodside KJ, Hu M, Burke A, Murakami M, Pounds LL, Killewich LA, Daller JA, Hunter GC.  
Related Articles, Links  
Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases.  
J Vasc Surg. 2003 ; **38** : 162-169.

- Wrighton SA, Ring BJ, Watkins PB, VandenBranden M.  
Identification of a polymorphically expressed member of the human cytochrome P-450III family.  
*Mol Pharmacol.* 1989 ; **36** : 97-105.
- Wrighton SA, Schuetz EG, Thummel KE, Shen DD, Korzekwa KR, Watkins PB.  
The human CYP3A subfamily: practical considerations.  
*Drug Metab Rev.* 2000 ; **32** : 339-361.
- Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR, Zeldin DC  
Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic epoxygenase highly expressed in heart.  
*J. Biol.Chem.* 1996 ; **271** : 3460- 3468.
- Wu S, Chen W, Murphy E, Gabel S, Tomer KB, Foley J, Steenbergen C, Falck JR, Moomaw CR, Zeldin DC.  
Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes.  
*J Biol Chem.* 1997 ; **272** : 12551-12559.
- Xiang S, Parsons HK, Murray M.  
Identification of a novel transcriptional silencer in the protein-coding region of the human CYP2C9 gene.  
*Gene.* 1998 ; **209** : 123-129.
- Xiao ZS, Goldstein JA, Xie HG, Blaisdell J, Wang W, Jiang CH, Yan FX, He N, Huang SL, Xu ZH, Zhou HH.  
Differences in the incidence of the CYP2C19 polymorphism affecting the S-mephenytoin phenotype in Chinese Han and Bai populations and identification of a new rare CYP2C19 mutant allele.  
*J Pharmacol Exp Ther.* 1997 ; **281** : 604-609.
- Xie W, Barwick JL, Simon CM, Pierce AM, Safe S, Blumberg B, Guzelian PS, Evans RM.  
Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR.  
*Genes Dev.* 2000 ; **14** : 3014-3023.
- Xie W, Radominska-Pandya A, Shi Y, Simon CM, Nelson MC, Ong ES, Waxman DJ, Evans RM.  
An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 ; **98** : 3375-3380.
- Xing D, Miller A, Novak L, Rocha R, Chen YF, Oparil S.  
Estradiol and progestins differentially modulate leukocyte infiltration after vascular injury.  
*Circulation.* 2004 ; **109** : 234-241.
- Yamada H, Dahl ML, Lannfelt L, Viitanen M, Winblad B, Sjoqvist F.  
CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in an elderly Swedish population.  
*Eur J Clin Pharmacol* 1998 ; **54** : 479-481.
- Yamakoshi Y, Kishimoto T, Sugimura K, Kawashima H.  
Human prostate CYP3A5: identification of a unique 5'-untranslated sequence and characterization of purified recombinant protein.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 1999 ; **260** : 676-681.
- Yamamoto S, Kusonose E, Ogita K, Kaku M, Ichihara K and Kusunose M,  
Role of cytochrome P450 in co-hydroxylation of prostaglandins,

J. Biochem (Tokyo). 1984 ; **96** : 593-603.

Yamazaki H, Shimada T.

Effects of arachidonic acid, prostaglandins, retinol, retinoic acid and cholecalciferol on xenobiotic oxidations catalysed by human cytochrome P450 enzymes.

**Xenobiotica**. 1999 ; **29** : 231-241.

Yang CS, Yoo JS, Ishizaki H, Hong JY.

Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation.

**Drug Metab Rev**. 1990 ; **22** : 147-159.

Yang B, Graham L, Dikalov S, Mason RP, Falck JR, Liao JK, Zeldin DC.

Overexpression of cytochrome P450 CYP2J2 protects against hypoxia-reoxygenation injury in cultured bovine aortic endothelial cells.

**Mol Pharmacol**. 2001 ; **60** : 310-320.

Yasar U, Eliasson E, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Gadd M, Sjoqvist F, Dahl ML.

The role of CYP2C9 genotype in the metabolism of diclofenac in vivo and in vitro.

**Eur J Clin Pharmacol**. 2001 ; **57** : 729-735.

Yasar U, Bennet AM, Eliasson E, Lundgren S, Wiman B, De Faire U, Rane A.

Allelic variants of cytochromes P450 2C modify the risk for acute myocardial infarction.

**Pharmacogenetics**. 2003 ; **13** : 715-720.

Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T

Leukotriene B4 : metabolism and signal transduction.

**Arch. Biochem. Biophys**. 2001 ; **385** : 231-241.

Yu M, McAndrew RP, Al-Saghir R, Maier KG, Medhora M, Roman RJ, Jacobs ER.

Nitric oxide contributes to 20-HETE-induced relaxation of pulmonary arteries.

**J Appl Physiol**. 2002 ; **93** : 1391-1399.

Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V.

Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?

**Atherosclerosis**. 2000 ; **148** : 209-214.

Yun CH, Shimada T, Guengerich FP.

Roles of human liver cytochrome P4502C and 3A enzymes in the 3-hydroxylation of benzo(a)pyrene.

**Cancer Res**. 1992 ; **52** : 1868-1874.

ZeldinDC, Dubois RN Falk JR, Capdevila JH

Molecular cloning, expression and characterization of an endogenous human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase isoform.

**Arch Biochem Biophys**. 1995 ; **322** : 76-86.

Zeldin DC, Moomaw CR, Jesse N et al.

Biochemical characterization of the human liver cytochrome P450 arachidonic acid pathway

**Arch. Biochem. Biophys**. 1996 ; **330** : 87-96.

Zelko I, Negishi M.

Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes.

**Biochem Biophys Res Commun**. 2000 ; **277** : 1-6.

Zhang X, Chen L, Hardwick JP.

Promoter activity and regulation of the CYP4F2 leukotriene B(4) omega-hydroxylase gene by

peroxisomal proliferators and retinoic acid in HepG2 cells.  
*Arch Biochem Biophys.* 2000(a) ; **378** : 364-376.

Zhang X and Hardwick JP  
Regulation of CYP4F2 leukotriene B4 w-hydroxylase by retinoic acids in HepG2 cells  
*Biochem. Biophys. Res. Com.* 2000(b) ; **279** : 864-871.

Zhao W, Parrish AR, Ramos KS.  
Constitutive and inducible expression of cytochrome P450IA1 and P450IB1 in human vascular endothelial and smooth muscle cells.  
*In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998 ; **34** : 671-673.

Zhao XJ, Jones DR, Wang YH, Grimm SW, Hall SD. Related Articles, Links  
Reversible and irreversible inhibition of CYP3A enzymes by tamoxifen and metabolites.  
*Xenobiotica.* 2002 ; **32** : 863-878.

Zhao X, Pollock DM, Inscho EW, Zeldin DC, Imig JD.  
Decreased renal cytochrome P450 2C enzymes and impaired vasodilation are associated with angiotensin salt-sensitive hypertension.  
*Hypertension.* 2003 ; **41** : 709-714.

Zhu D, Effros RM, Harder DR, Roman RJ, Jacobs ER.  
Tissue sources of cytochrome P450 4A and 20-HETE synthesis in rabbit lungs.  
*Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998 ; **19** : 121-128.

Zhu D, Bousamra M II, Zeldin DC, Falck JR, Townsley M, Harder DR, Roman RJ, and Jacobs ER.  
Epoxyeicosatrienoic acids constrict isolated pressurized rabbit pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 ; **278** : L335-L343.

Zhu D, Zhang C, Medhora M, Jacobs ER.  
CYP4A mRNA, protein, and product in rat lungs : novel localization in vascular endothelium. *J Appl Physiol.* 2002 ; **93** : 330-337.

Zuber R, Modriansky M, Dvorak Z, Rohovsky P, Ulrichova J, Simanek V, Anzenbacher P.  
Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities.  
*Phytother Res.* 2002 ; **16** : 632-638.

Zweier JL, Kuppusamy P, Gorman-Thomson S, Klunk D, Luty GA.  
Measurement and characterization of free radical generation in reoxygenated human endothelial cells.  
*Am. J. Physiol.* 1994 ; **266** : C700-C708.

