



**HAL**  
open science

# Origine des anticorps anti-tissus apparaissant dans les hépatites médicamenteuses de type immuno allergiques

Catherine Pons

► **To cite this version:**

Catherine Pons. Origine des anticorps anti-tissus apparaissant dans les hépatites médicamenteuses de type immuno allergiques. Biologie animale. Université Paris-Diderot - Paris VII, 1989. Français. NNT: . tel-00653612v2

**HAL Id: tel-00653612**

**<https://theses.hal.science/tel-00653612v2>**

Submitted on 20 Jun 2020

**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.

Claudine,  
Toute mon amitié  
pour ces années  
passées ensemble,  
Catherine

THESE de DOCTORAT  
de  
L'UNIVERSITE PARIS 7

Spécialité:

**TOXICOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE**

présentée par **Catherine PONS** pour obtenir le titre de

**Docteur de l'UNIVERSITE PARIS 7**

*Origine des anticorps anti-tissus apparaissant  
dans des hépatites médicamenteuses de  
type immuno-allergique*

soutenue le 11 septembre 1989 devant le jury composé de:

Madame le Professeur S. PUISEUX-DAO, Président et rapporteur

Monsieur le Professeur J.P. LEROUX, Rapporteur

Monsieur le Professeur J.C. HOMBERG, Examineur

Madame le Docteur A. ROLLAND, Examineur

Monsieur le Docteur D. MANSUY, Examineur

A mes parents...

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (Unité Associée au CNRS en développement concerté avec l'INSERM, UA 400), Université René Descartes, Paris V, sous la direction de Mr Daniel Mansuy, directeur du laboratoire.

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Daniel Mansuy qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a confié ce sujet de recherche, de l'intérêt constant qu'il a porté à ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma très vive reconnaissance pour la formation scientifique que j'ai pu acquérir à ses côtés.

J'ai eu le plaisir d'être l'élève de Mme le Pr Puisieux-Dao. Elle m'a fait partager son enthousiasme pour la toxicologie. Je la remercie d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie Mme le Dr Rolland qui a accepté de juger ce travail, ainsi que les Laboratoires Anphar Rolland, pour leur soutien financier.

Mr le Pr Homberg m'a chaleureusement accueillie au sein de son équipe. Il m'a initiée aux techniques d'immunofluorescence et a mis à ma disposition les sérums à la base de ce travail. Il s'est toujours montré d'une extrême gentillesse et disponibilité. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie Mr le Pr Leroux d'avoir accepté de juger ce travail. Son accueil au sein de l'U 75 et l'aide de ses collaborateurs m'ont été des plus précieux.

C'est à Patrick Dansette que revient le mérite de ces recherches. Non seulement il a été à l'origine de ce travail, mais il s'est montré présent tout au long de celui-ci. Son aide, ses conseils, sa gentillesse et sa disponibilité, malgré ses nombreuses activités au laboratoire ne m'ont jamais fait défaut. Les mots sont insuffisants pour lui exprimer ma gratitude et mon amitié.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans la collaboration de l'équipe d'Henri Hoellinger. Je tiens à le remercier pour l'accueil dans son laboratoire et les discussions fructueuses que nous avons eues.

Que Michelle Sonnier qui a participé activement à ce travail et avec laquelle j'ai eu beaucoup de plaisir à collaborer, trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amitié sincère.

Je tiens à remercier particulièrement Mme Grégeois pour les nombreuses heures passées devant son cryostat et sa bonne humeur communicative qui ont permis de mener à bien certains aspects de cette étude.

Je remercie Mme le Dr Nicole Maurin pour le temps qu'elle a consacré aux études histologiques malgré ses nombreuses charges. Ce fut un plaisir de travailler ensemble, qu'elle trouve ici le témoignage de mon amitié. Je n'oublierai pas l'accueil souriant et la disponibilité de son assistante.

Ce travail aurait pris un temps infini sans les nombreuses aides dont j'ai pu bénéficier:

- Que Mrs le Pr Ph. Beaune, le Dr R.C. Wolf et Mme le Dr E.E. Billett, toujours prêts à nous fournir le matériel biologique nécessaire à ces études soient ici remerciés.

- Je remercie Liliane Kiffel pour son aide, ses conseils, les discussions intéressantes et les échanges de résultats. En témoignage de ma sympathie.

- La faculté des Saints-Pères abrite des équipes chaleureuses auprès desquelles j'ai trouvé aide et conseils. Je tiens à remercier tout particulièrement Mme le Dr Cittanova, Mr le Pr Engler et Mr le Pr Weinmann, ainsi que F. Schoentgen, J. Weinmann, J. Feinberg, P. Urio, G. Katsanis et J.M. le Pecq.

- Je n'oublierai pas les membres de l'UA 400 : C. Amar, C. Asselin, G. Bouillé, M. Jaouen, E. Neau et M. Delaforge, qui m'ont assistée, entourée de leur amitié et qui ont permis que ce travail se déroule dans des conditions agréables.

Enfin, pour Maryvonne Sitbon, le témoignage de mon amitié sincère après ces années d'études passées ensemble.

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

## Résumé

A l'origine de cette étude, des auto-anticorps anti-LKM2 (Liver Kidney Microsomes) avaient été détectés par immunofluorescence indirecte sur coupes de foie de rats dans le sérum de patients ayant fait une hépatite après prise d'acide tiénilique (Diflurex). Il avait été montré au laboratoire que ces anticorps sont dirigés contre un cytochrome P-450 humain responsable du métabolisme du médicament, le cytochrome P-450-8 (IIC).

Nous avons émis une hypothèse quant au mécanisme conduisant à l'apparition de ces auto-anticorps et élaboré un modèle d'étude chez l'animal.

Nous avons tout d'abord déterminé, par différentes techniques biochimiques, la protéine hépatique de rat reconnue par les anticorps anti-LKM2. Ces anticorps réagissent de façon croisée avec une forme constitutive de cytochrome P-450 hépatique de rat, le cytochrome P-450-UT-A (IIC11) qui est majoritaire dans le foie de rats non traités. Cette reconnaissance croisée permet de comprendre le test clinique de détection des anticorps anti-LKM2 sur coupes de foie de rats.

Nous avons ensuite montré qu'un traitement des rats par l'acide tiénilique, après certaines inductions hépatiques, fait apparaître à la surface de leurs hépatocytes un néo-antigène reconnu par les anticorps anti-LKM2.

Afin de généraliser le mécanisme d'apparition d'anticorps anti-tissus proposé, nous nous sommes intéressés à l'hépatite induite par l'iproniazide (Marsilid) où des anticorps spécifiques anti-mitochondries (anti-M6) ont été détectés dans le sérum des patients. Nous avons montré que ces anticorps reconnaissent une protéine de la membrane externe des mitochondries de foie humain, la monoamine oxydase B (MAO B), qui est inhibée de façon irréversible par l'iproniazide.

Il s'agit du troisième exemple d'hépatite médicamenteuse de type immuno-allergique avec apparition d'anticorps anti-tissus où ces anticorps semblent dirigés contre une protéine responsable de l'activation métabolique du médicament.

**Mots clés :** Auto-anticorps, hépatite, cytochrome P-450, monoamine oxydase, anti-M6, anti-LKM2, acide tiénilique, iproniazide.

## S O M M A I R E

=====

### Liste des Abréviations

<b>CHAPITRE I - INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
I.1. SITUATION DU SUJET.....	2
I.2. LES HEPATITES MEDICAMENTEUSES DE TYPE IMMUNO-ALLERGIQUE.....	2
I.2.1. Caractéristiques des hépatites médicamenteuses de type immuno-allergique.....	2
I.2.2. Problème de prédiction des hépatites médicamenteuses de type immuno-allergique.....	3
I.2.3. Mécanismes proposés pour les hépatites médicamenteuses de type immuno-allergique...	3
I.3. FORMATION DE METABOLITES REACTIFS ET CYTOCHROMES P-450.....	5
I.3.1. Généralités sur le cytochrome P-450.....	6
I.3.2. Différentes formes de cytochromes P-450 hépatiques connues.....	11
I.3.3. Formation de métabolites réactifs.....	20
I.4. LES ANTICORPS ANTI-TISSUS EN PATHOLOGIE HEPATIQUE	24
I.4.1. Détection des anticorps anti-tissus.....	25
I.4.2. Relation entre le type d'auto-anticorps et l'origine de l'hépatite.....	27
I.5. EXEMPLE DE DEUX MEDICAMENTS RESPONSABLES D'HEPATITES DE TYPE IMMUNO-ALLERGIQUE.....	29
I.5.1. Cas de l'halothane.....	29
I.5.2. Cas de l'acide tiénilique.....	31
I.6. MOTIVATION DU TRAVAIL.....	34
I.6.1. Problème.....	34
I.6.2. Stratégie suivie.....	34
<b>CHAPITRE II - MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>38</b>
II.1. MATERIELS.....	39
II.1.1. Produits chimiques.....	39
II.1.2. Animaux.....	39
II.1.3. Traitements.....	40
II.1.4. Sérums.....	41
II.1.5. Cytochromes P-450 purifiés de foie de rat	41
II.1.6. Foies humains.....	42

II.2. ETUDES BIOCHIMIQUES.....	42
II.2.1. Microsomes .....	42
II.2.2. Mitochondries.....	44
II.2.3. Fixation covalente de l'acide tiénilique ou de son isomère sur les protéines microsomales	47
II.2.4. Electrophorèse et immuno-transfert.....	48
II.2.5. Fluorographie.....	51
II.3. ETUDES IMMUNOLOGIQUES.....	51
II.3.1. Immunisation d'animaux.....	51
II.3.2. Test ELISA des sérums de lapins immunisés.	52
II.3.4. Immunofluorescence sur coupes d'organes...	54
II.3.5. Histologie.....	54
II.3.6. Immunofluorescence sur hépatocytes isolés.	56

**CHAPITRE III - ETUDE DE LA CAPACITE DE RECONNAISSANCE  
DES ANTICORPS ANTI-LKM2 VIS-A-VIS DES MICROSOMES**

HEPATIQUES DE RAT.....	59
OBJECTIFS.....	60
III.1. DETERMINATION PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNO-TRANSFERT DES CONSTITUANTS MICROSOMAux HEPATIQUES DE RAT RECONNUS PAR LES ANTICORPS ANTI-LKM2.....	60
III.1.1. Séparation électrophorétique des protéines microsomales hépatiques.....	60
III.1.2. Reconnaissance des constituants microsomaux de foie humain et de rat par les anticorps anti-LKM2 et par certains anticorps anti- cytochromes P-450 de rat.....	66
III.1.3. Conclusion.....	76
III.2. INHIBITION DE LA TRANSFORMATION DE L'ACIDE TIENILIQUE OU DE SON ISOMERE (CRE 4316) EN METABOLITES REACTIFS PAR LES ANTICORPS ANTI-LKM2.....	78
III.2.1. Fixation covalente de métabolites réactifs de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur des protéines microsomales de foie humain...	80
III.2.2. Inhibition de la transformation de l'isomère de l'acide tiénilique (CRE 4316) en métabo- lites réactifs par les anticorps anti-LKM2	82

III.2.3. Fixation covalente de métabolites réactifs de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur des protéines microsomales hépatiques de rat.....	86
III.2.4. Inhibition de la transformation de l'isomère de l'acide tiénilique (CRE 4316) en métabolites réactifs par les anticorps anti-LKM2...	88
III.2.5. Conclusion.....	88
III.3. REACTIVITE DES ANTICORPS ANTI-LKM2 SUR COUPES DE FOIE DE RATS DIFFEREMMENT TRAITES.....	91
III.3.1. Rappels.....	91
III.3.2. Réactivité des anticorps anti-LKM2 sur coupes de foie de rats différemment traités.....	96
III.3.3. Comparaison du profil de reconnaissance, en immunofluorescence indirecte sur coupes d'organes, des anticorps anti-LKM2 et de divers anticorps anti-cytochromes P-450 hépatiques de rat.....	108
III.4. CONCLUSION.....	112
CHAPITRE IV - ETUDE DE L'APPARITION DE NOUVEAUX ANTIGENES A LA SURFACE D'HEPATOCYTES DE RATS TRAITES PAR L'ACIDE TIENILIQUE.....	119
OBJECTIFS.....	120
IV.1. ETUDE DE L'APPARITION DE NOUVEAUX ANTIGENES A LA SURFACE D'HEPATOCYTES DE RATS TRAITES.....	121
IV.1.1. Influence du traitement des rats sur la reconnaissance en immunofluorescence de leurs hépatocytes par les anticorps anti-LKM2....	121
IV.1.2. Etude de la reconnaissance d'antigènes de surface hépatocytaire par divers anticorps anti-cytochromes P-450 hépatiques de rat...	132
IV.2. ETUDE DE L'APPARITION D'UNE PROTEINE HAPTENISEE A LA SURFACE D'HEPATOCYTES DE RATS TRAITES PAR L'ACIDE TIENILIQUE.....	137
IV.2.1. Obtention d'anticorps anti-acide tiénilique.	137
IV.2.2. Test des anticorps anti-acide tiénilique sur hépatocytes de rats traités par l'acide tiénilique.....	141
IV.3. CONCLUSION.....	143

<b>CHAPITRE V - DETERMINATION DES PROTEINES HEPATIQUES RECONNUES PAR LES ANTICORPS ANTI-MITOCHONDRIES (ANTI-M6) APPARAISSANT DANS LE SERUM DE PATIENTS LORS D'UNE HEPATITE A L'IPRONIAZIDE.....</b>	<b>146</b>
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>147</b>
<b>V.1. GENERALITES SUR LES MONOAMINE OXYDASES.....</b>	<b>147</b>
<b>V.2. L' IPRONIAZIDE EN TANT QU'INHIBITEUR IRREVERSIBLE DES MONOAMINE OXYDASES.....</b>	<b>150</b>
<b>V.3. IMMUNOPRECIPITATION DES MONOAMINE OXYDASES DE FOIE PAR LES ANTICORPS ANTI-M6.....</b>	<b>151</b>
<b>V.3.1. MAO A et B.....</b>	<b>157</b>
<b>V.3.2. Différenciation des MAO A et B.....</b>	<b>162</b>
<b>V.4. IMMUNOPRECIPITATION DE LA MONOAMINE OXYDASE DE PLACENTA HUMAIN PAR LES ANTICORPS ANTI-M6.....</b>	<b>165</b>
<b>V.5. MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE RESIDUELLE DES MONOAMINE OXYDASES DES MITOCHONDRIES DE FOIE HUMAIN APRES IMMUNOPRECIPITATION PAR LES ANTICORPS ANTI-M6</b>	<b>167</b>
<b>V.6. RECONNAISSANCE PAR IMMUNO-TRANSFERT DE PROTEINES MITOCHONDRIALES DE FOIE HUMAIN PAR LES ANTICORPS ANTI-M6.....</b>	<b>169</b>
<b>V.7. CONCLUSION.....</b>	<b>171</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>172</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>178</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>193</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>198</b>

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES  
=====

LKM	Liver Kidney Microsome (microsome de foie et de rein)
M	Mitochondrie
AT	Acide tiénilique
CRE 4316	Isomère en 3 de l'acide tiénilique
5-OHAT	5-Hydroxy-acide tiénilique
BSA	Bovine Serum Albumine (albumine sérique bovine)
CAS	Caséine
BSA-AT	Acide tiénilique couplé à la BSA
CAS-AT	Acide tiénilique couplé à la Caséine
AT-GLY	Amide dérivé de l'acide tiénilique couplé à la glycine
Ac-FEN	Acide fénofibrique
Parach.THIO	Parachlorobenzoyl-2-thiophène
TFA	Trifluoroacétyle
TEM	Témoin
PB	Phénobarbital
CLO	Clofibrate
BNF	$\beta$ -Naphtoflavone
PCN	Cyano-16 $\alpha$ -pregnenolone
3MC	Méthyl-3 cholanthrène
TAO	Triacétate d'oléandomycine
FEN	Fénofibrate
ISF	Isosafrole
CLO-AT	Clofibrate puis acide tiénilique
MP	Méphénytoïne
DB	Débrisoquine
EH	Epoxyde hydrolase
MAO	Monoamine oxydase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
FAD	Flavine adénine dinucléotide
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
kd	Kilodalton
Ig	Immunoglobuline

E.S. Erreur standard  
Ā anti-  
SDS Sodium dodécyl sulfate  
ABTS Acide azino-2,2' di(éthyl-3 benzothiazole sulfonique)  
DAB Tétrachlorure de diamino-3,3' benzidine  
PBS Phosphate Buffer Solution (tampon phosphate)  
TCA Acide trichloracétique  
CHAPS [(Cholamidopropyl-3)diméthyl-ammonio]-1 propane sulfonate

## I.1. SITUATION DU SUJET

Des études récentes ont montré que certains médicaments ne révélant aucune toxicité sur les modèles animaux utilisés classiquement pour les dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché, peuvent cependant conduire à des effets hépatotoxiques secondaires chez quelques patients (environ 1 cas sur 10.000) (1). Ces manifestations hépatiques de type immuno-allergique sont très difficiles à prévoir à l'heure actuelle, du fait du manque de connaissances de leur mécanisme et de l'absence de modèles animaux prédictifs.

En effet, deux types de phénomènes peuvent être à l'origine d'hépatites médicamenteuses :

- une toxicité directe facilement détectable lors des études toxicologiques chez l'animal,
- une toxicité de type immuno-allergique dépendant de la sensibilité particulière de certains sujets (idiosyncrasie). Sur 641 médicaments répertoriés comme responsables d'atteintes hépatiques, 103, soit 16 %, provoquent ce type de toxicité (2).

## I.2. LES HÉPATITES MÉDICAMENTEUSES DE TYPE IMMUNO-ALLERGIQUE

### I.2.1. CARACTERISTIQUES DES HEPATITES MEDICAMENTEUSES DE TYPE IMMUNO-ALLERGIQUE

Une hépatite de type immuno-allergique est suspectée à partir des critères suivants (3) :

- une fréquence faible (environ 1 cas sur 10.000),
- pas de relation effet-dose apparente,
- une période de sensibilisation (1 à 5 semaines),
- une association de manifestations d'hypersensibilité extra-hépatiques (fièvre, éruption cutanée, éosinophilie...),
- une réapparition du trouble après réadministration du médicament responsable,
- la présence d'anticorps anti-tissus dans le sérum de ces malades dans 14 % des cas (2).

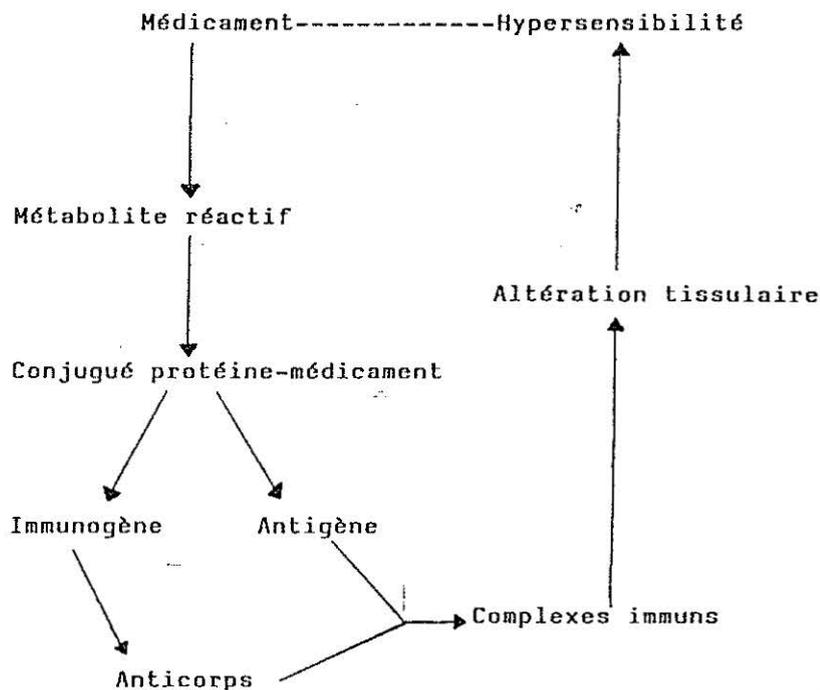
I.2.2. PROBLEME DE PREDICTION DES HEPATITES MEDICAMENTEUSES DE TYPE IMMUNO-ALLERGIQUE

Lors des études toxicologiques chez l'animal les effets hépatotoxiques secondaires de type immuno-allergique d'un médicament ne peuvent être prédits. Les essais de mise au point d'un modèle animal pour reproduire ce type d'hépatotoxicité n'ont pas conduit, jusqu'à présent, à des résultats satisfaisants (4).

I.2.3. MECANISMES PROPOSES POUR LES HEPATITES MEDICAMENTEUSES DE TYPE IMMUNO-ALLERGIQUE

Le mécanisme des hépatites médicamenteuses de type immuno-allergique a donné lieu à de nombreuses hypothèses et propositions. Nous retiendrons ici la plus communément admise, faisant intervenir la formation d'un métabolite réactif (5, 6). La figure 1 illustre l'hypothèse de formation d'un haptène proposée par PARK et coll. (7).

Fig. 1 : Hypothèse de formation d'un haptène dans les réactions d'hypersensibilité induite par des médicaments (d'après 7).



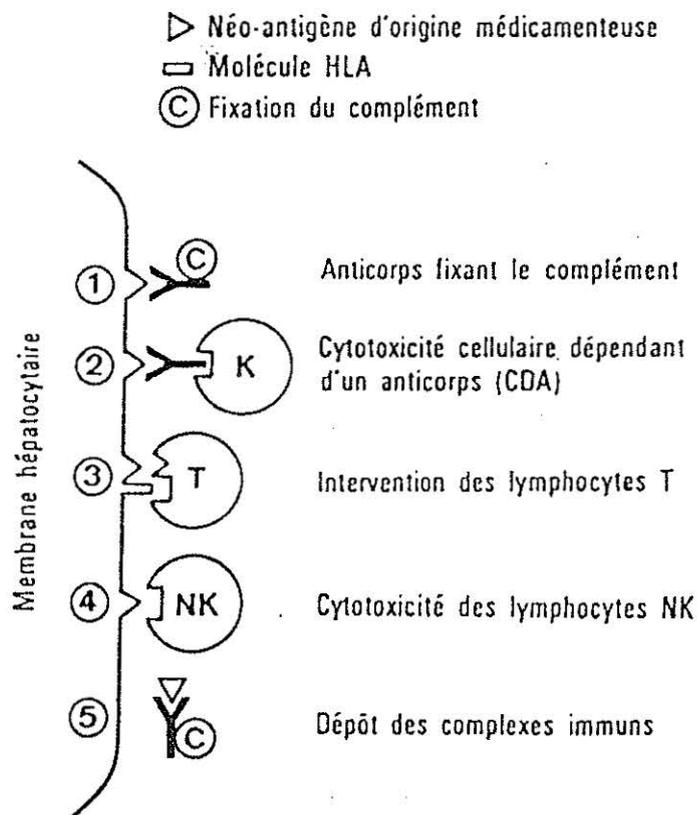
Différentes étapes conduisent à l'apparition de phénomènes hépatotoxiques de type immuno-allergique. Le médicament responsable est tout d'abord transformé en métabolite réactif. Ce métabolite instable peut réagir sur des protéines présentes et former un conjugué protéine-médicament. Cette protéine, modifiée par le médicament, devient immunogène. Le système immunitaire produit alors des anticorps qui vont former des complexes immuns avec la protéine antigénique. L'étape finale consiste en une altération tissulaire avec manifestations d'hypersensibilité.

Ce schéma résulte d'un mécanisme général que l'on va pouvoir adapter ici à la cellule hépatique. L'hépatocyte n'est la cible d'une réaction immunitaire que si l'antigène en cause (protéine modifiée par le médicament) est exprimé à la surface de la cellule. Cette expression membranaire pourrait résulter d'une migration de l'antigène de la membrane du réticulum endoplasmique, site de production du métabolite réactif, vers la membrane cellulaire, ou de la fixation directe du métabolite réactif sur un constituant membranaire. Cette structure, protéine-haptène, servirait alors de cible au système immunitaire.

Les mécanismes immunitaires capables de lyser l'hépatocyte ont été décrits par CALMUS et coll. (8) et sont résumés figure 2. L'anticorps, après interaction avec l'antigène, peut fixer le complément ou être reconnu par des cellules "killer". La lyse hépatocytaire peut résulter de l'intervention directe des cellules immunitaires (lymphocytes T spécifiques ou cellules "natural killer") ou du dépôt de complexes immuns sur la membrane cellulaire.

Ce problème des hépatites médicamenteuses de type immuno-allergique est donc complexe et d'accès très difficile. Mais, d'après les mécanismes proposés, deux faits importants sont à considérer, d'une part, l'activation métabolique du médicament avec formation de métabolites réactifs et, d'autre part, l'existence éventuelle d'anticorps anti-tissus.

Fig. 2 : Mécanismes immunitaires dans l'hépatotoxicité médicamenteuse de type immuno-allergique (d'après 8).



### I.3. FORMATION DE MÉTABOLITES RÉACTIFS ET CYTOCHROMES P-450

Déjà, dans les années 1950, on suspectait que de nombreux xénobiotiques n'étaient pas toxiques en eux-mêmes, mais seulement après métabolisation en espèces électrophiles capables de modifier des composants cellulaires. Depuis, cette hypothèse a été largement confirmée (9, 10).

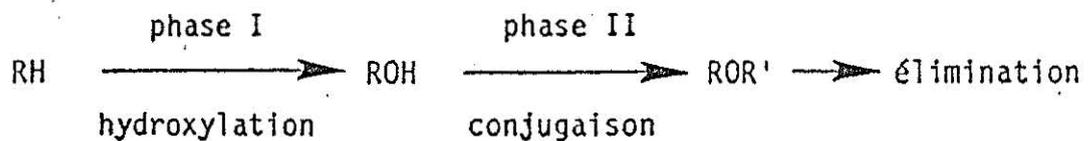
L'activation métabolique de composés exogènes est assurée par différents systèmes enzymatiques présents dans les cellules (monooxygénases à cytochrome P-450, monooxygénases à flavine, peroxydases, glutathion S-transférases, époxyde hydrolases, UDP-glucuronyl-transférases...). Cependant, le système enzymatique

impliqué de façon majoritaire dans la bioactivation de xénobiotiques est lié au cytochrome P-450 (9). Ce dernier, particulièrement étudié, a donné lieu à une bibliographie importante ; aussi, nous ne développerons ici que les éléments indispensables à la compréhension des hépatites médicamenteuses.

### I.3.1. GENERALITES SUR LE CYTOCHROME P-450

De nombreux composés exogènes et, parmi eux, les médicaments, sont trop hydrophobes pour être directement éliminés par l'organisme. La plupart des êtres vivants disposent de systèmes enzymatiques de détoxification capables de transformer ces composés en dérivés plus hydrosolubles, facilement éliminables. Cette réaction de détoxification comporte deux phases, schématisées figure 3.

Fig. 3 : Réaction de détoxification.



Lors de la phase I, des monooxygénases hydroxylent le composé à éliminer. Dans un très grand nombre de cas, cette réaction est catalysée par des cytochromes P-450. Lors de la phase II, des enzymes, dites de conjugaison, couplent au composé hydroxylé des entités hydrophiles afin de le rendre encore plus hydrosoluble (10). L'action conjuguée de ces deux systèmes enzymatiques joue un rôle prépondérant en pharmacologie et toxicologie.

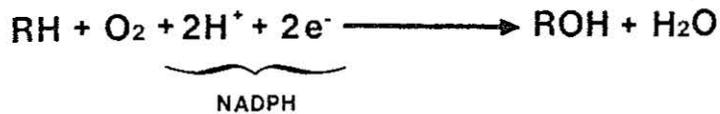
#### I.3.1.1. Historique

Entre 1940 et 1950, MUELLER et MILLER étudient la déméthylation oxydative du diméthyl-azobenzène en présence d'homogénats de foie (11, 12). Quelques années plus tard, BRODIE et coll.

(13) reprennent ces expériences pour examiner le métabolisme oxydatif de certains médicaments. Ce n'est qu'en 1958 que KLINGENBERG (14) et GARFINKEL (15) notent la présence d'un pigment fixant le monoxyde de carbone dans les microsomes de foie de Mammifères. Ces microsomes, réduits et traités par le monoxyde de carbone absorbent aux environs de 450 nm, contrairement aux complexes formés entre le monoxyde de carbone et d'autres hémoprotéines qui présentent une bande de Soret autour de 420 nm. En 1964, OMURA et SATO (16) démontrent que ce pigment hépatique est une hémoprotéine dénommée alors cytochrome P-450.

### I.3.1.2. Structure et fonctionnement

Les cytochromes P-450 sont les constituants majeurs d'un système multi-enzymatique, les monooxygénases qui, par activation de l'oxygène moléculaire, permettent d'incorporer un atome d'oxygène au niveau d'un substrat selon la réaction globale :



Les cytochromes P-450 possèdent des caractéristiques structurales particulières. L'hème des cytochromes P-450 est la protoporphyrine IX de fer (figure 4). Le fer est coordonné aux quatre azotes pyrroliques de la protoporphyrine et à un ligand cystéinate assurant la liaison avec l'apoprotéine. Celle-ci est une chaîne peptidique de poids moléculaire compris entre 48 et 60 kd, selon les cytochromes P-450. Cette chaîne protéique forme une cavité hydrophobe où pénètrent les substrats pour y être hydroxylés (figure 5).

L'oxydation d'un substrat par les monooxygénases requiert la présence, en plus du cytochrome P-450, de deux éléments :

- un donneur d'électrons, généralement le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH),

Fig. 4 : Protoporphyrine IX de fer.

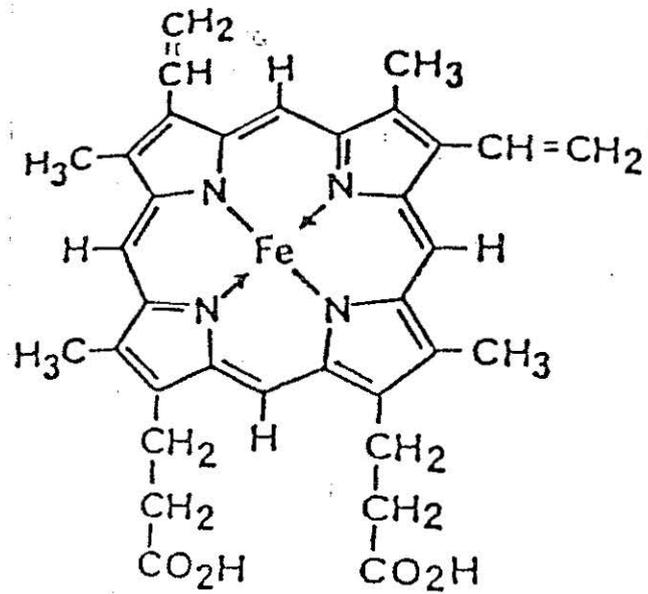
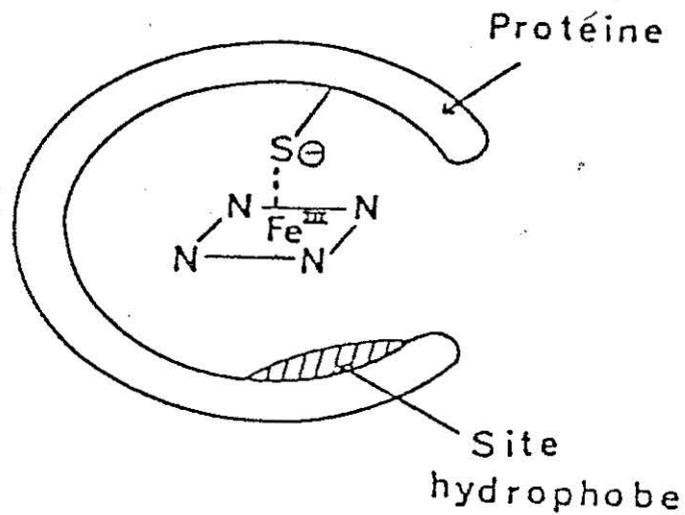


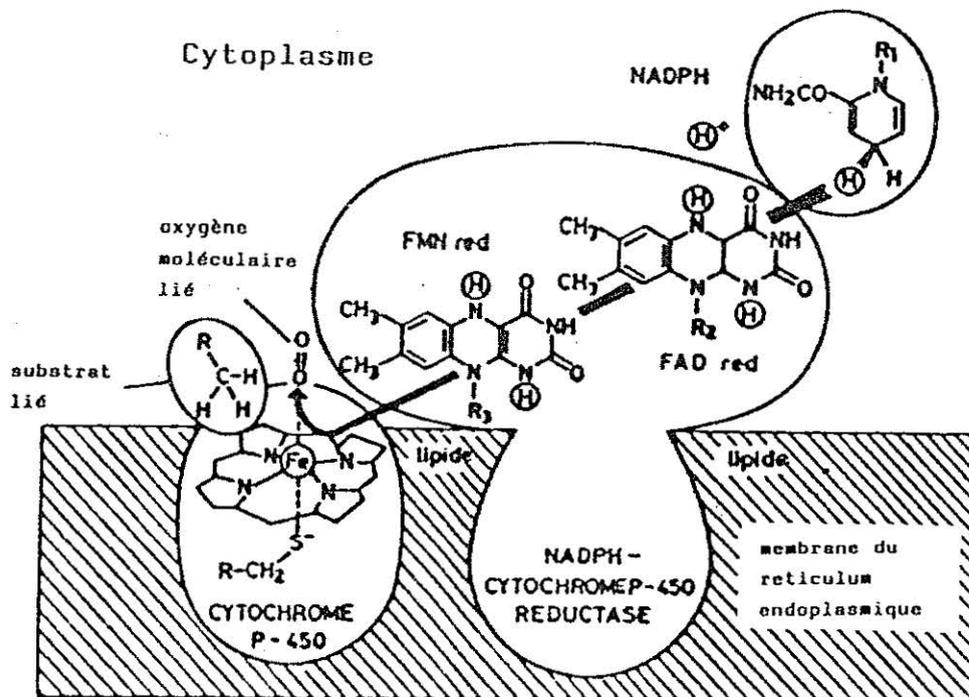
Fig. 5 : Représentation schématique du cytochrome P-450.



- une flavoprotéine, la NADPH-cytochrome P-450 réductase, qui assure le transfert au cytochrome P-450 des électrons provenant du NADPH. Cette enzyme comporte une mole de flavine adénine dinucléotide (FAD) et une mole de flavine mononucléotide (FMN) par mole d'apoprotéine.

L'organisation des monooxygénases est schématisée figure 6 (17). Ce système, très réactif, est capable d'hydroxyler une grande variété de composés et même de réduire des dérivés halogénés. Ce manque de spécificité assure l'efficacité de la détoxification des composés exogènes en général.

Fig. 6 : Transport d'électrons du NADPH au cytochrome P-450. (d'après 17).



#### I.3.1.3. Localisation

Les cytochromes P-450 ont une localisation très ubiquitaire dans l'organisme. Ils sont principalement situés dans le foie et présents, en plus faible quantité, dans de nombreux organes (reins, poumons, intestin, peau, artères...). Dans la cellule, ils sont répartis au niveau du réticulum endoplasmique lisse et rugueux, du noyau, de la membrane cellulaire et des mitochondries.

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux cytochromes P-450 responsables du métabolisme des xénobiotiques. Ces enzymes sont surtout localisées au niveau du réticulum endoplasmique des hépatocytes. Ils sont présents in vitro dans les microsomes hépatiques obtenus après centrifugations différentielles d'homogénats de foie.

#### I.3.1.4. Induction des cytochromes P-450 chez l'animal

Les isoenzymes du cytochrome P-450 sont nombreuses chez l'animal non traité. Cependant, le traitement des animaux par certains composés augmente la concentration en cytochromes P-450 dans les protéines microsomales et stimule sélectivement des activités enzymatiques. Les modifications observées (propriétés spectrales et catalytiques, profil électrophorétique des préparations microsomales) montrent qu'une induction modifie la répartition des isoenzymes du cytochrome P-450 et peut faire apparaître une ou plusieurs formes n'existant pas chez l'animal non traité. Selon les isoenzymes induites, les inducteurs ont été groupés en 5 catégories (18). La première, la plus importante est celle des molécules de type phénobarbital (PB). Elle comprend, outre le phénobarbital, de nombreux composés dont la structure chimique peut être très différente du phénobarbital lui-même. Une deuxième catégorie regroupe les hydrocarbures polyaromatiques. On y distingue la dioxine (TCDD), le benzo(a)pyrène

(BP), la  $\beta$ -naphtoflavone (BNF), le méthyl-3-cholanthrène (3MC). Dans la troisième catégorie, on trouve des dérivés de type stéroïdes comprenant des glucocorticoïdes comme la dexaméthasone (DEM). Le dérivé le plus utilisé est la cyano-16 $\alpha$ -pregnenolone (PCN). Cependant, certains antibiotiques macrolides, tel le triacétate d'oléandomycine (TAO) font également partie de ces inducteurs. Une autre classe d'inducteur est déterminée par le clofibrate (CLO), hypolipidémiant, et ses analogues structuraux, comme le fénofibrate (FEN). L'éthanol constitue une autre catégorie d'inducteur comprenant également l'acétone, l'isoniazide....

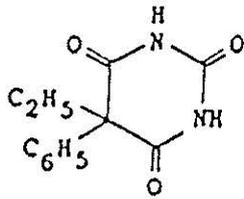
La figure 7 représente les structures de ces principaux composés.

### I.3.2. DIFFERENTES FORMES DE CYTOCHROMES P-450 HEPATIQUES CONNUES

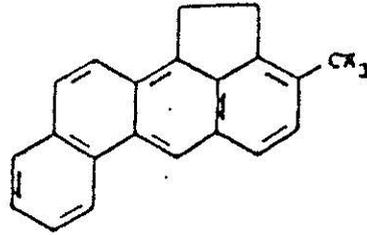
#### I.3.2.1. Les isoenzymes du cytochrome P-450 hépatique de rat

L'existence de nombreuses isoenzymes du cytochrome P-450 joue un rôle important dans le métabolisme des médicaments. Ce domaine, abondamment étudié, nous amène tout d'abord à répertorier les différentes formes de cytochromes P-450 hépatiques de rat isolées à ce jour par les principales équipes travaillant sur ce sujet, dont celles de WOLF, LEVIN, GUENGERICH et WAXMAN. L'identification de ces formes a été réalisée en comparant les propriétés des préparations de cytochromes P-450 obtenues par ces différents laboratoires. Cette comparaison a porté sur la longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe cytochrome P-450-CO, sur les activités catalytiques (nature des substrats oxydés), les propriétés immunochimiques (reconnaissance croisée d'une isoenzyme par un anticorps dirigé contre une autre isoenzyme), sur la séquence N-terminale et la mobilité électrophorétique et enfin, sur la réponse aux inducteurs. Les progrès de la biologie moléculaire ont également permis de caractériser ces isoenzymes par la séquence de leur ADN ou ADN complémentaire, ou de la protéine elle-même.

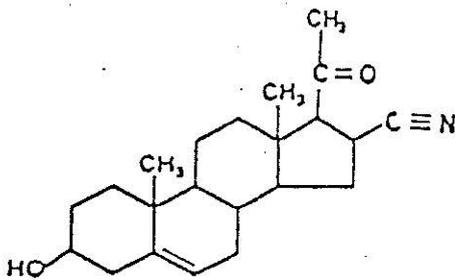
Fig. 7 : Inducteurs classiques des cytochromes P-450 chez l'animal de laboratoire.



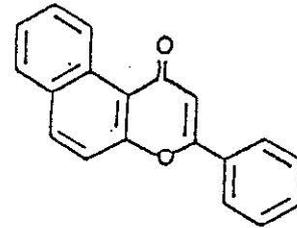
Phénobarbital (PB)



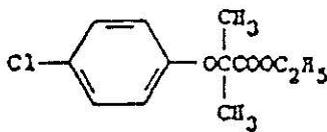
Méthyl-3 cholanthrène (3MC)



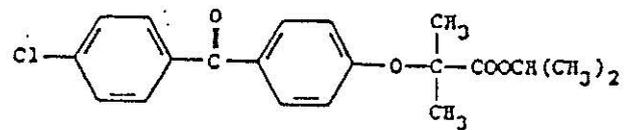
Cyano-16 -pregnenolone (PCN)



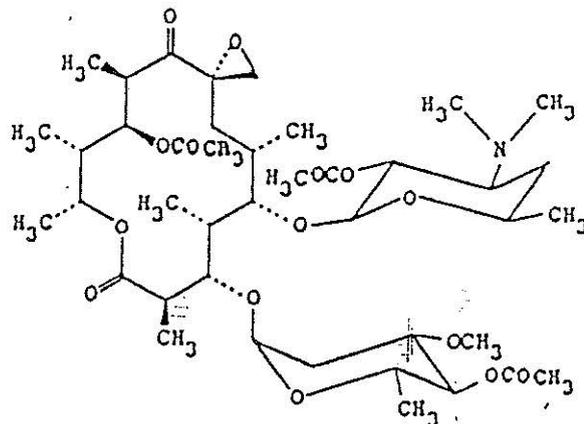
β-naphtoflavone (BNF)



Clofibrate (CLO)



Fépofibrate (FEN)



Triacétate d'oléandomycine (TAO)

A partir de ces données, une nomenclature officielle des isoenzymes du cytochrome P-450 a été récemment établie (19). Le tableau 1 donne la liste des cytochromes P-450 hépatiques de rat actuellement connus avec leur nomenclature suivant le laboratoire où ils ont été isolés (20, 21, 22, 23) et la nomenclature officielle préconisée. La nomenclature de GUENGERICH, la plus simple à mémoriser, sera retenue pour la suite de ce travail. Elle correspond à l'induction utilisée pour la purification de chaque isoenzyme (UT : formes présentes chez les animaux non traités ; PB : phénobarbital ; PCN : cyano-16 $\alpha$ -pregnenolone ; BNF :  $\beta$ -naphthoflavone ; ISF : isosafrole). Le tableau 2 décrit l'origine (induction, sexe) et les activités oxydantes connues des différentes formes de cytochromes P-450 hépatiques de rat (23). Nous voyons par exemple que le cytochrome P-450 UT-A (IIC11), est présent chez le rat mâle adulte non traité. Il n'est pas augmenté par des inducteurs et il catalyse trois types de réactions (hydroxylation, oxydation et N-déméthylation). Les substrats indiqués ici sont des substrats endogènes ou exogènes connus pour être oxydés par ce cytochrome P-450.

Chaque forme de cytochrome P-450 est plus particulièrement présente, soit chez des rats non traités (UT), soit chez des rats spécifiquement induits par différents composés. En effet, certaines formes existant en faible proportion chez des rats non traités (les formes PB ou PCN par exemple) voient leur taux hépatique considérablement augmenter après une induction spécifique (24). A l'inverse, la forme constitutive majoritaire (UT-A), en quantité importante chez des rats non traités, se trouve proportionnellement diminuée après traitement par des inducteurs (PB, PCN, 3MC).

Tableau 1 : Nomenclature des cytochromes P-450 hépatiques de rat d'après 19, 20, 21, 22, 23).

Wolf	Levin	Guengerich	Waxman	Autres	Nomenclature recommandée
mc1b	c	BNF-B	-	-	IA1
mc1a	d	ISF-G	MC2	-	IA2
ut1	a	UT-F	PB3	a1	IIA1
				a2	IIA2
				a3	IIA3
pb3a	b	PB-B	PB4	-	IIB1
pb3b	e	PB-D	PB5	-	IIB2
-	-	-	-	IIB3	IIB3
pb1b	k	PB-C	PB1	pTF2	IIC6
pb1a	-	-	-	-	-
pb2b	-	-	-	-	-
-	f	-	-	pTF1	IIC7
pb2a	h	UT-A	PB2c	M-1, 16 $\alpha$ , RLM5 mâle	IIC11
-	i	UT-I	PB2d	15 $\beta$ femelle	IIC12
-	g	-	-	-	IIC13
-	-	UT-H	-	db1, CMF1a	IID1
-	-	-	-	db2, CMF2	IID2
-	-	-	-	db3	IID3
-	-	-	-	db4, CMF3	IID4
-	-	-	-	db5, CMF1b	IID5
-	j	-	-	alcool	IIE1
	-	-	-	olf1	IIG1
pb2c	p	PCN-E	PB2a	pcn1	IIIA1
-	-	-	-	pcn2	IIIA2
p-452	-	-	-	LAW1	IVA1
-	-	-	-	LAW2	IVA2
-	-	-	-	LAW3	IVA3
-	-	-	-	5	IVB1
-	-	-	-	17 $\alpha$	XVIIA1

Tableau 2 : Spécificité, inductibilité et activité oxydante de cytochromes P-450 hépatiques de rat (d'après 23).

Cytochromes P-450	Origine	Activités oxydantes connues
UT-F(IIA1)	Rat non traité	hydroxylation : testostérone (7 $\alpha$ ), androstenedione (7 $\alpha$ ), progestérone (7 $\alpha$ )
UT-H (IID1)	Rat non traité	hydroxylation : débrisoquine (4) bufuralol (1'), propranolol (4) oxydation : spartéine ( $\Delta^5$ ) O-déméthylation : encainamide dextrometorphan
UT-A(IIC11)	Rat mâle adulte non traité	hydroxylation : testostérone (2 $\alpha$ ) oestradiol (2 et 4), warfarine (4' et 6), vitamine D3. oxydation : acétaminophène, nifédipine. N-déméthylation : éthyl-morphine
UT-I(IIC12)	Rat femelle adulte non traitée	hydroxylation : 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ diol 3,17 disulfate (15 $\beta$ )
PB-C(IIC6)	Rat non traité ou induit par PB	hydroxylation : warfarine (7) N-oxydation : azoprocabazine
PB-B,D (IIB1,2)	Rat induit par PB	hydroxylation : warfarine (4'), testostérone (16 $\alpha$ , $\beta$ , 17 $\beta$ ), androstenedione (16 $\beta$ ) O-déalkylation : 7-pentoxyrésorufine. N-déméthylation : d-benzphétamine, aminopyrine
PCN-E(IIIA1)	Rat non traité ou induit par PCN, TAO ou PB	hydroxylation : warfarine (10), testostérone (6 $\beta$ ), oestradiol (2 et 4), méphénytoïne (4). N-déméthylation : éthyl-morphine
ISF-G(IA2)	Rat induit par ISF ou des hydrocarbures polycycliques	hydroxylation : oestradiol (2 et 4), acétanilide (4) N-oxygénation : amines aromatiques, pyrolysats d'acides aminés
BNF-B(IA1)	Rat induit par 3MC, BNF ou hydrocarbures polycycliques	hydroxylation : hydrocarbures polycycliques, testostérone (6 $\beta$ ), warfarine (6 et 8) N-oxygénation : amines aromatiques O-dééthylation : 7-éthoxyrésorufine
P-452(IVA1)	Rat non traité ou induit par CLO	hydroxylation : acide laurique (11 et 12)

Les cytochromes P-450 sont répertoriés sous la nomenclature de GUENGERICH et la nomenclature officielle. Les activités oxydantes connues sont indiquées comme suit : activité : substrat (position d'oxydation).

### I.3.2.2. Différentes formes de cytochromes P-450 de foie humain

La même approche a été réalisée à partir des différents cytochromes P-450 de foie humain, à l'exclusion du phénomène d'induction difficilement étudié chez l'Homme pour des raisons éthiques.

Le tableau 3 indique les isoenzymes du cytochrome P-450 hépatique humain actuellement connues par isolement de la protéine ou par séquence de son ADN ou de l'ADNc (19, 25, 26). La nomenclature recommandée est basée sur des données génétiques (séquence des ADN ou ADNc) mais pas sur l'isolement de la protéine elle-même. Cela explique que, sur la vingtaine d'isoenzymes humaines répertoriées, seule une dizaine de cytochromes P-450 a été complètement caractérisée à la fois au niveau de la protéine (isolement et séquence) et de son ADN ou ADNc (clonage et séquence).

Si l'on considère les formes de cytochromes P-450 hépatiques humaines responsables de l'hydroxylation en position 4 de la S-méphénytoïne, au moins trois protéines différentes ont été isolées et plusieurs ADN ou ADNc séquencés. Cette sous-famille de cytochromes P-450 de foie humain a donné lieu à de nombreuses études en raison du polymorphisme génétique de cette activité enzymatique. Deux à 5 % de la population d'origine Caucasienne sont hydroxylateurs lents ainsi que 13 % de la population du Japon (27). Une protéine possédant l'activité méphénytoïne hydroxylase, avait tout d'abord été isolée ; il s'agissait du cytochrome P-450-8 (28) ou Meph(29). Puis deux protéines, appelées respectivement MP1 et MP2, de même activité, ont été à leur tour isolées et caractérisées par des techniques classiques (30). A l'aide de la biologie moléculaire, un ADNc, relatif à cette sous-famille de cytochrome P-450, a été cloné puis séquencé, la séquence protéique déduite et comparée aux séquences N-terminales des protéines préalablement isolées (31). Depuis, une troisième protéine a été identifiée, MP3,

Tableau 3 : Différents cytochromes P-450 de foie humain : nomenclature et substrats caractéristiques (d'après 19,25,26).

Différentes nomenclatures			Substrats caractéristiques	Nomenclature recommandée
ADNc	ADN	Protéines		
P1	P1	P1		IA1
P3,4	4	PA	Phénacétine	IA2
P-450(1) IIA3				IIA3
LM2				IIB6
IIB7				IIB7
IIB8				IIB8
1, IIC2, mp-12 mp-20		MP3	S-méphénytoïne Rétinol	IIC8
IIC1,mp-4		MP	S-Méphénytoïne	IIC9
mp, mp-8		MP	S-Méphénytoïne Tolbutamide	IIC10
db1		BUF,DB	Débrisoquine Spartéine Bufuralol	IID6
	IID7			IID7
	IID8			IID8
j	j	HLj,alc	Alcool	IIE1
IIF <sub>1</sub>				IIF1
HLp		NF, 5	Nifédipine,Cortisol Cyclosporine	IIIA3
nf-25, pcn1,nf-10			Nifédipine	IIIA4
pcn3				IIIA5
SCC	SCC		Cholestérol	XIA1
17 $\alpha$	17 $\alpha$			XVIIA1
arom			Androstenedione	XIXA1
C21B	C21B			XXIA2

portant une activité supplémentaire (32). D'autres ADNc de cette sous-famille de cytochromes P-450 ont été également séquencés (33).

Cet exemple illustre la complexité du problème en ce qui concerne la caractérisation des différentes isoenzymes du cytochrome P-450. Les techniques très sophistiquées de la biologie moléculaire permettent d'isoler sans cesse de nouvelles formes ne différant parfois des formes connues que par quelques acides aminés.

#### I.3.2.3. Homologies existant entre cytochromes P-450 de foie humain et de rat

Dans le but d'extrapoler à l'Homme les études du métabolisme de xénobiotiques effectuées chez l'animal (le rat notamment), il semblait intéressant de comparer les différentes formes de cytochromes P-450 de foie humain à celles présentes chez le rat. Le tableau 4 résume l'état actuel des travaux, tous laboratoires confondus (23, 26). Les homologies présentées, entre cytochromes P-450 de foie humain et de rat, sont basées d'une part sur une réactivité immunologique croisée (reconnaissance d'une forme par des anticorps dirigés contre une autre forme) et, d'autre part, sur la comparaison des séquences N-terminales. Les séquences des ADN ou ADNc n'étant pas toutes connues, ce critère n'a pas été utilisé pour l'élaboration de ce tableau. Une analogie a, par exemple, été déterminée, entre les cytochromes P-450 responsables de la 4-hydroxylation de la S-méphénytoïne (MP) chez l'Homme et les cytochromes P-450 hépatiques présents chez les rats non traités mâles (UT-A) ou femelles (UT-I).

Tableau 4

Homologies entre cytochromes P-450 de foie humain et de rat  
(d'après 23, 26)

Cytochromes P-450 humains	Cytochromes P-450 de rat (GUENGERICH)
MP3(IIC8)	UT-A (IIC11) UT-I (IIC12)
MP (IIC9)	UT-A (IIC11) UT-I (IIC12)
MP (IIC10)	UT-A (IIC11) UT-I (IIC12)
BUF, DB (IID6)	UT-H (IID1)
NF, 5 (IIIA3)	PCN-E (IIIA1)
PA (IA2)	ISFG (IA2)
P1 (IA1)	BNF-B (IA1)

### I.3.3. FORMATION DE METABOLITES REACTIFS

Les différentes formes de cytochromes P-450 hépatiques jouent un rôle majeur dans la détoxification de xénobiotiques mais, paradoxalement, elles peuvent être également à l'origine de phénomènes toxiques.

Certains composés exogènes incluant divers médicaments (Tableau 5)(34), comme l'acétaminophène, l'acide tiénilique, sont transformés en métabolites réactifs. Ces métabolites instables sont formés par différents types de mécanismes et ont des structures chimiques très diverses (époxydes, carbocations, radicaux), comme il est décrit figure 8 (10). L'oxydation par le cytochrome P-450 de dérivés présentant une insaturation peut conduire à la formation d'époxydes (chlorure de vinyle), celle de dérivés aminés à des hydroxylamines réactives (acétaminofluorène) ou à des carbocations (diméthyl nitrosamine). La formation d'entités réactives par les cytochromes P-450 peut également résulter d'une réduction avec production de radicaux libres (tétrachlorure de carbone)(10). Ces métabolites formés ont en commun la propriété d'être très électrophiles et très réactifs vis-à-vis des nucléophiles tissulaires. Deux cas peuvent alors se produire : soit le métabolite réactif est pris en charge et détoxiqué à l'aide d'enzymes spécifiques (époxyde hydrolases), soit il peut contracter des liaisons covalentes irréversibles avec différents constituants cellulaires (35).

Dans ces deux cas, le métabolite électrophile va réagir sur des sites nucléophiles. Or, dans la cellule, un des sites nucléophiles les plus abondants se trouve être le groupement thiol de la cystéine. Ce groupement est présent dans les protéines mais aussi dans un tripeptide, le glutathion, ayant un rôle protecteur majeur au niveau cellulaire. La glutathion-S-transférase catalyse la détoxification de métabolites réactifs par conjugaison avec le glutathion. Ce système de détoxification n'est pas toujours suffisant en cas de métabolisation massive et les

Tableau 5 : Médicaments hépatotoxiques connus pour être transformés en métabolites réactifs (d'après 34).

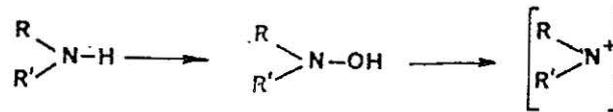
Acétaminophène	Erythromycine	Métronidazole
Acide tiénilique	Estrogènes naturels	Nitrofurantoïne
Alphaméthylidopa	Ethinylestradiol	Noréthistérone
Benoxaprofène	Fluoxène	Phénacétine
BCNU (Carmustine)	Halothane	Phénylbutazone
CCNU (Lomustine)	Hycanthone	Phénytoïne
Chloramphénicol	Imipramine	Propranolol
Chloroforme	Iproniazide	Propylthiouracile
Chlorpromazine	Isaxonine	Trichloroéthylène
Cyclophosphamide	Isoniazide	Troléandomycine
Dantrolène	Méthimazole	Uréthane
Enflurane	Méthoxyflurane	

Fig. 8 : Mécanismes conduisant à la formation de métabolites réactifs (d'après 10).

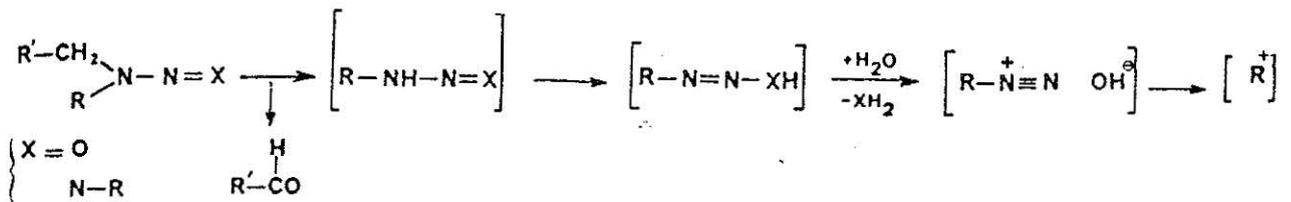
. Dérivés présentant une insaturation : formation d'époxydes



. Dérivés aminés : formation d'hydroxylamines réactives



. Dérivés aminés : formation de carbocation par N-désalkylation



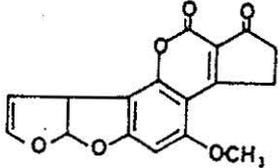
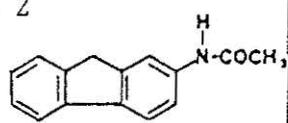
métabolites formés peuvent alors se fixer sur d'autres constituants nucléophiles. Plusieurs cas de figures sont alors envisageables en fonction de la réactivité intrinsèque et de la durée de vie (stabilité) du métabolite réactif (9, 10, 36). Ces cas sont résumés dans le tableau 6.

Le métabolite formé à l'intérieur de la poche hydrophobe du cytochrome P-450 peut directement réagir sur celui-ci. Une destruction du cytochrome P-450 (sulfure de carbone, fluroxène...) ou un blocage de cette enzyme par différents mécanismes sont possibles. Les dérivés d'amphétamines forment un complexe avec  $Fe^{++}$ . Les métabolites de dérivés présentant une insaturation alkylent les azotes de l'hème. Le chloramphénicol, quant à lui, est métabolisé en dérivés se fixant sur les lysines de l'apoprotéine. Les conséquences d'une inactivation des cytochromes P-450 sont importantes dans le cas d'une association médicamenteuse. Si un médicament est administré en association avec un composé bloquant les cytochromes P-450 après activation métabolique, le médicament ne sera plus métabolisé comme s'il avait été administré seul et, par conséquent, n'aura plus les mêmes effets thérapeutiques quantitatifs ou qualitatifs. C'est le cas par exemple des antibiotiques macrolides impliqués dans un certain nombre d'interactions médicamenteuses (37).

Le métabolite formé peut également sortir de la poche hydrophobe du cytochrome P-450 et réagir sur des fonctions des acides aminés (SH,  $NH_2$ , OH...). C'est le cas par exemple de l'acrylonitrile ou du thioacétamide (9). Il se fixe alors de façon covalente sur des protéines cellulaires par alkylation.

Lorsque le métabolite formé a une durée de vie plus longue, il va pouvoir réagir sur l'ADN ou l'ARN en alkylant les bases puriques ou pyrimidiques. Il s'agit notamment de métabolites réactifs de cancérigènes tels le benzo(a)pyrène, l'aflatoxine (10).

Tableau 6 : Macromolécules cibles des métabolites réactifs  
issus de différents composés (d'après 9, 10, 36)

Macromolécules cibles	Mécanisme réactif	Exemples de composés
Cytochrome P-450	Destruction	Sulfure de carbone $CS_2$
		Nitroso-diméthyl-amine $\begin{array}{c} CH_3 \\   \\ N-N=O \\   \\ CH_3 \end{array}$
	Blocage	Fluroxène (anesthésique) $CF_3-CH_2-O-CH=CH_2$
		Amphétamines $\text{C}_6\text{H}_5-CH_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-NH_2$
Alkylation des azotes de l'hème	Benzo-1,3 dioxole $\begin{array}{c} R_1 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_3 \\   \\ R_2 \end{array} \begin{array}{c} O \\ / \\ \text{C} \\ \backslash \\ O \end{array} \begin{array}{c} CH_2 \\   \\ \text{C} \\ \backslash \\ \text{C} \\ / \\ \text{C} \\ \backslash \\ O \end{array}$	
	Chlorure de vinyle $CH_2=CHCl$	
Alkylation de l'apo-protéine	Nonène $CH_2=CH(CH_2)_7CH_3$	
Protéines cellulaires	Alkylation des fonctions des acides aminés (OH (TYR), NH(LYS), SH(CYS))	Chloramphénicol $\begin{array}{c} NHCOCHCl_2 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\   \\ HO-CH-CH_2OH \end{array}$
		Acrylonitrile $CH_2=CHCN$
ADN	Alkylation des bases nucléiques N7(G), N aromatique ou aliphatique, O, C8(A), phosphate	Thioacétamide $C_2H_5NS$
		Aflatoxines 
Lipides membranaires	Peroxydation par formation de radicaux	Acétylamino-2 fluorène 
		Tétrachlorure de carbone $CCl_4$
		Acétaminophène $CH_3CONH-C_6H_4-OH$

Le cytochrome P-450 peut se comporter comme un réducteur et déshalogéner certains haloalcanes (exemple, le tétrachlorure de carbone) pour former des radicaux libres. Ces radicaux se fixent alors sur des lipides et induisent une peroxydation lipidique qui aura pour conséquences de déstabiliser les membranes et d'entraîner une lyse cellulaire (10).

#### I.4. LES ANTICORPS ANTI-TISSUS EN PATHOLOGIE HÉPATIQUE

La recherche d'anticorps anti-tissus dans le sérum de malades est utile au diagnostic étiologique et à la surveillance d'un certain nombre d'affections hépatiques, au premier rang desquelles se situent la cirrhose biliaire primitive et les hépatites de type immuno-allergique.

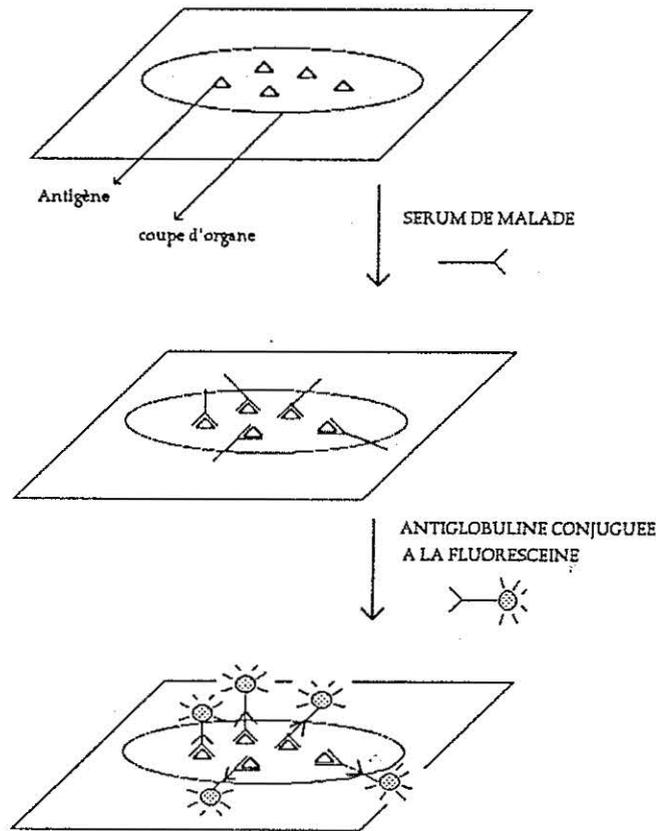
Le terme d'anticorps anti-tissus est utilisé pour les désigner par opposition aux anticorps spécifiques d'organe trouvés notamment dans la pathologie endocrinienne et par opposition aux anticorps anti-médicaments. Le premier anticorps anti-tissus non spécifique d'organe et d'espèce a été décrit en 1965 : il s'agissait d'un anticorps anti-mitochondrie (M). Depuis, d'autres anticorps anti-tissus ont été détectés dans le sérum de patients atteints d'affections hépatiques : anticorps anti-muscle lisse (SM), anticorps anti-microsomes de foie et de rein (LKM), anticorps anti-ribosomes (R), anticorps anti-cytosol hépatique (LC). Au cours de nombreuses observations, ces anticorps ont pu être divisés en sous-groupes (exemple, anticorps anti-mitochondries, M1 à M6), faisant apparaître une relation entre la présence d'un anticorps anti-tissus particulier et une affection hépatique (38).

Ces anticorps anti-tissus reconnaissent des antigènes présents au niveau des noyaux ou des organites intra-cytoplasmiques de nombreuses cellules et de différentes espèces.

### I.4.1. DETECTION DES ANTICORPS ANTI-TISSUS

L'immunofluorescence indirecte est la méthode de choix pour le dépistage d'anticorps anti-tissus (39). Elle est réalisée sur coupes d'organes congelés (foie, rein, estomac, principalement) de rat, et de souris de façon complémentaire. Le test consiste à incuber ces coupes, dans un premier temps avec le sérum du malade, puis avec une antiglobuline marquée à la fluorescéine qui va révéler les anticorps fixés sur le tissu (figure 9).

Fig. 9 : Test d'immunofluorescence indirecte



Chaque anticorps anti-tissus (anti-M, SM, LKM, LC) est identifié par son profil de reconnaissance en immunofluorescence indirecte, c'est-à-dire suivant les intensités de fluorescence obtenues pour chaque organe et type cellulaire. Le tableau 7 indique les profils de reconnaissance des principaux anticorps anti-tissus rencontrés (40).

Tableau 7 : Profil de reconnaissance par immunofluorescence indirecte d'anticorps anti-tissus sur différentes coupes d'organes (d'après 40)

	Hépatocyte	Rein							Estomac				Pancreas	
		G	P1	P2	P3	TLH	D	CD	P	C	M	APUD	Exo	Endo
Anti-M1	++	-	+	+	+	-	+++	-	+	+	+	?	+	+
Anti-M2a	+	(+)	++	++	++	-	+++	+	+++	+	+	?	+	+
Anti-M2b	+	-	(+)	(+)	(+)	+	+++	+++	+++	(+)	(+)	?	(+)	(+)
Anti-M3	++	++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	++	+++	?	+	+
Anti-M4	+	(+)	++	++	++	-	+++	+	+++	+	+	?	+	+
Anti-M5	+	-	+++	+++	++	-	+	-	++	+	+++	?	-	+
Anti-M6	+++	-	+++	(+)	-	++	-	-	-	-	-	+++	-	+++
Anti-LKM1	+++	-	+	++	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Anti-LKM2	+++	-	+++	+++	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Anti-R	+++	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	+++	-	?	+++	-

Coupes d'organes (toutes espèces confondues) : foie, rein (G : glomérule, P1 à P3 : tube proximal, TLH : anse grêle de Henlé, D : tube distal, CD : tube collecteur), estomac (P : cellules pariétales, C : cellules principales, M : cellules de la musculosae), pancréas (exocrine et endocrine). Intensité de fluorescence des anticorps anti-mitochondries (M1 à M6), anti-microsomes de foie et de rein (LKM1,2) anti-ribosomes (R).

En considérant dans ce tableau 7 les anticorps anti-LKM2, ceux-ci donnent une fluorescence intense au niveau des hépatocytes et des segments P1 et P2 du tube proximal du rein. La fluorescence est plus faible au niveau de P3 et des cellules de la couche musculosae de l'estomac. Aucune fluorescence n'est observée

au niveau des autres types cellulaires. L'obtention de ce profil particulier de fluorescence avec un sérum de malade permettra de diagnostiquer la présence d'anticorps anti-LKM2 dans ce sérum. Ce tableau résume, de façon générale, la réactivité des différents anticorps anti-tissus par rapport aux sous-structures tissulaires, toutes espèces confondues. Nous verrons par la suite qu'il peut y avoir quelques petites différences pour un même anticorps suivant que l'on utilise des organes de rat ou de souris (par exemple, l'intensité de fluorescence des anticorps anti-LKM2 au niveau des hépatocytes périportaux est différente chez le rat et chez la souris mâle, mais est identique au niveau des hépatocytes centrolobulaires).

Chaque anticorps anti-tissus est dirigé contre une organelle cellulaire. Aucune fluorescence ne peut donc être observée si l'on teste un sérum qui a été préalablement adsorbé sur la fraction subcellulaire contre laquelle il contient des anticorps. Cette expérience, appelée extinction de fluorescence, permet de vérifier que tel anticorps est dirigé contre tel organite cellulaire.

#### I.4.2. RELATION ENTRE LE TYPE D'AUTO-ANTICORPS ET L'ORIGINE DE L'HEPATITE

##### I.4.2.1. Hépatites infectieuses

Des anticorps anti-tissus ont été détectés dans le sérum de patients atteints d'hépatites infectieuses :

- anti-noyau et anti-muscle lisse (hépatite B),
- anti-LKM  $\delta$  (hépatite D)
- anti-M1 (syphilis hépatique).

#### I.4.2.2. Hépatites sans étiologie connue

Trois types d'hépatites dont l'origine reste encore indéterminée conduisent à l'apparition d'anticorps anti-tissus dans le sérum des malades :

- la cirrhose biliaire primitive (CBP) (anticorps anti-mitochondries M2, M4, M8 et M9),
- l'hépatite auto-immune de type I ou hépatite lupoïde (anticorps anti-noyau et anti-muscle lisse),
- l'hépatite auto-immune de type II ou hépatite chronique active (CAH) (anticorps anti-LKM1 et anti-LC1)

#### I.4.2.3. Hépatites médicamenteuses

Nous ne développerons pas ici les hépatites médicamenteuses aiguës mais nous nous focaliserons sur les hépatites chroniques d'origine médicamenteuse dont les lésions sont comparables à celles des hépatites chroniques actives. Cependant, les médicaments responsables de ce type d'hépatite provoquent également des hépatites aiguës. Il est à remarquer que la présence d'auto-anticorps dans le sérum de patients atteints d'hépatite médicamenteuse ne se produit qu'avec certains médicaments.

Selon le type d'anticorps apparaissant dans les hépatites qu'ils déclenchent, les médicaments ont été classés en trois groupes (40) :

- le premier groupe comprend l'oxyphénisatine, la clométacine, la nitrofurantoïne, la papavérine, le fénofibrate et l' $\alpha$ -méthylidopa. Des anticorps anti-muscles lisses, anti-noyaux et quelquefois anti-mitochondries ont été détectés dans le sérum des malades atteints d'hépatite après traitement par ces médicaments ;
- le deuxième groupe est constitué de 2 médicaments : l'acide tiénilique (Diflurex\*) et l'iproniazide (Marsilid\*). Ces deux médicaments conduisent chacun à l'apparition d'anticorps très

spécifiques, respectivement des anti-LKM2 (41) et des anti-mitochondries de type 6 (M6)(42). Nous reviendrons abondamment sur ces auto-anticorps tout au long de ce travail ;

- le troisième groupe ne comprend que l'halothane. Dans 25 % des hépatites provoquées par cet anesthésique, la présence d'anticorps anti-LKM1 est détectée dans le sérum des malades.

Bien sûr, cette liste est loin d'être exhaustive ; des anticorps ont été récemment détectés dans les sérums de malades présentant une hépatite à la dihydralazine (43) entre autres. Il s'agissait d'anticorps anti-microsomes de foie (anti-LM).

Dans la majorité des cas, la nature exacte de l'antigène contre lequel sont dirigés ces anticorps n'est pas connue.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement à deux médicaments : l'halothane et l'acide tiénilique, qui conduisent à des phénomènes hépatotoxiques de type immuno-allergique. En effet, ce sont les deux seuls cas où l'on possède quelques éléments de départ vers une compréhension des mécanismes de certaines étapes à l'origine de ces phénomènes hépatotoxiques.

## I.5. EXEMPLE DE DEUX MÉDICAMENTS RESPONSABLES D'HÉPATITES DE TYPE IMMUNO-ALLERGIQUE

### I.5.1. CAS DE L'HALOTHANE

L'halothane, un anesthésique halogéné, commercialisé dès 1953, et de loin le plus couramment utilisé dans le monde, a été rendu responsable de nécroses hépatiques dès 1958.

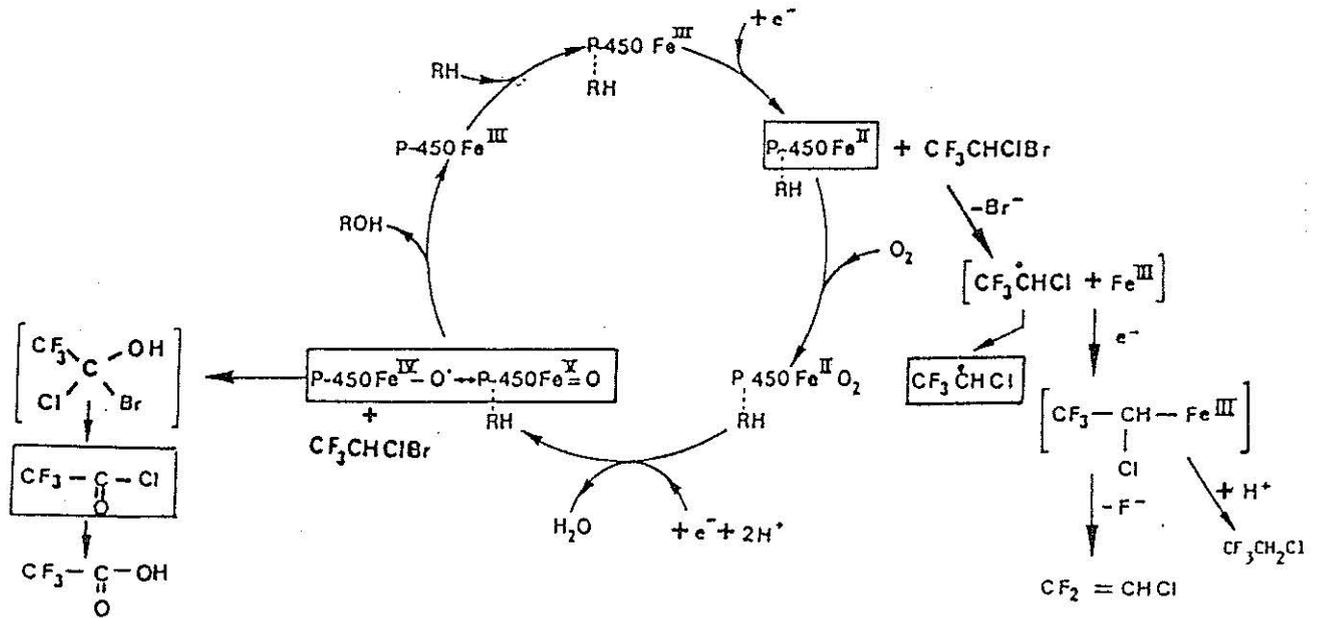
Deux types d'hépatites à l'halothane ont été mis en évidence (44) :

- une hépatotoxicité directe, généralement bénigne avec une élévation des transaminases et un taux de phosphatases alcalines modérément augmenté. Un examen histologique montre une nécrose centrolobulaire ;

- une hépatotoxicité de type immuno-allergique, rencontrée chez un petit nombre de patients (1 cas sur 30.000) mais sévère, se produisant généralement après réexposition sans relation effet/dose apparente et présence de caractères cliniques allergiques (éruption cutanée, fièvre, éosinophilie). Chez 25 % de ces malades, des anticorps anti-tissus de type LKM1 ont été détectés dans leur sérum (1, 45).

Différentes études ont démontré l'importance du métabolisme dans ces hépatites à l'halothane (46). La figure 10 montre que l'halothane est métabolisé selon deux voies, oxydative et réductrice, dont les importances relatives dépendent de la pression partielle en oxygène (47). Ces deux voies génèrent des métabolites réactifs capables d'alkyler les protéines hépatiques. La voie réductrice conduit à la formation d'un radical,  $CF_3\dot{C}HCl$ , qui est à l'origine de l'hépatotoxicité directe de l'halothane. La voie oxydative, quant à elle, génère  $CF_3COCl$  (TFA) entité réactive pouvant se fixer de façon covalente sur les protéines hépatiques. Ce métabolite est responsable de l'hépatotoxicité de type immuno-allergique. Il a été montré que  $CF_3COCl$  a la capacité de trifluoroacétyler les protéines hépatiques. En effet, des anticorps dirigés contre cet haptène (anticorps anti-TFA) reconnaissent spécifiquement par immuno-transfert deux protéines trifluoroacétylées (54 et 59 kd) dans les microsomes de rats induits par le phénobarbital, puis anesthésiés par l'halothane. La protéine de 54 kd a été identifiée comme étant la forme majeure des cytochromes P-450 induite par le phénobarbital (48). Ces mêmes anticorps anti-TFA ont permis, par immunofluorescence indirecte, de mettre en évidence la présence de protéines trifluoroacétylées au niveau de la membrane d'hépatocytes de rats traités par l'halothane (49). Les conséquences de l'apparition d'un néo-antigène à la surface des hépatocytes peuvent être déduites des résultats de DAVIS (46). Celui-ci a montré que l'incubation de sérums de malades, ayant fait un accident hépatique de type immuno-allergique et contenant des anticorps anti-

Fig. 10. : Métabolisme de l'halothane (d'après 47)



LKM1, en présence d'hépatocytes de lapins traités par l'halothane et de lymphocytes de sujets sains conduit à la lyse des hépatocytes. Ces résultats suggèrent que le métabolite réactif, formé par oxydation de l'halothane par un cytochrome P-450, se fixe sur celui-ci par liaison covalente et induit l'expression membranaire de cette protéine modifiée. Ce néo-antigène devient alors la cible du système immunitaire.

### 1.5.2. CAS DE L'ACIDE TIENILIQUE

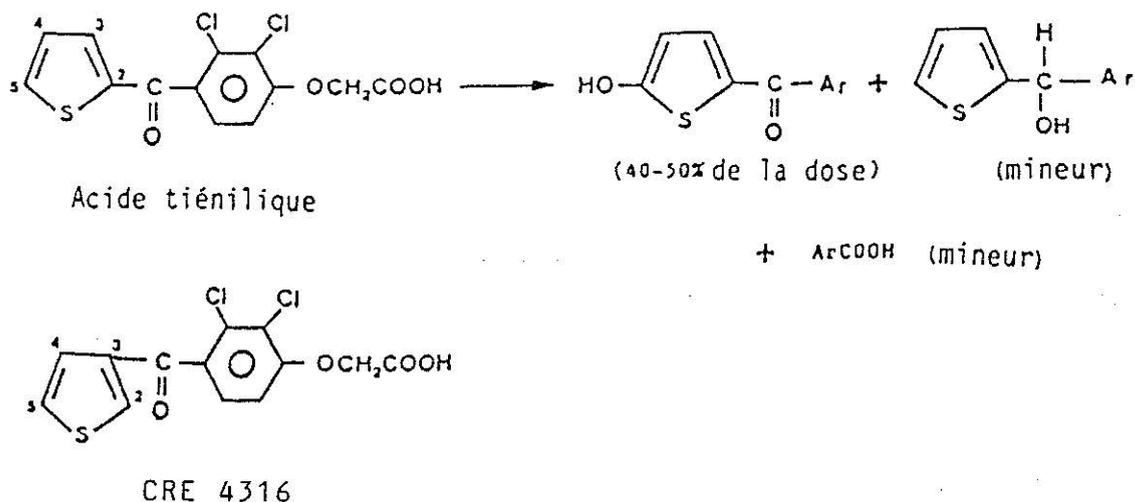
L'acide tiénilique (DiFlurex\*), diurétique uricosurique, a été mis sur le marché en 1976 par le laboratoire ANPHAR ROLLAND pour ses propriétés dans le traitement de l'hypertension. Introduit en 1979 aux Etats-Unis, il a, après quelques mois, été retiré de la vente du fait de l'apparition de phénomènes hépatotoxiques secondaires chez certains patients (1 cas sur 10.000) (50).

Le métabolisme de ce médicament a été étudié au laboratoire, en collaboration avec le centre de recherche ANPHAR ROLLAND, afin d'expliquer l'hépatotoxicité de l'acide tiénilique.

#### I.5.2.1. Métabolisme de l'acide tiénilique

L'acide tiénilique est métabolisé de façon importante chez l'Homme et chez le Rat. Le métabolite urinaire majeur dérive de l'hydroxylation en position 5 du noyau thiophène (figure 11). Ce métabolite représente 50 % de la dose chez l'Homme et 30 % chez le rat (51).

Fig. 11 : Métabolisme de l'acide tiénilique.



Ce métabolisme oxydatif est retrouvé in vitro par incubation de l'acide tiénilique (marqué au  $^{14}\text{C}$  sur la fonction cétone) en présence de microsomes hépatiques (humains ou de rats) et d'un système générateur d'électrons (NADPH) (52).

D'autre part, le laboratoire ANPHAR ROLLAND a montré que, in vivo, une proportion faible de l'acide tiénilique ou de ses métabolites est liée de façon covalente aux protéines hépatiques de rat. L'isomère en position 3 de l'acide tiénilique, le CRE 4316 (figure 11), donne, dans les mêmes conditions, un taux de fixation covalente dix fois plus élevé que l'acide tiénilique.

Des résultats similaires ont été retrouvés in vitro à partir de microsomes hépatiques de rats incubés en présence d'acide tiénilique ou de CRE 4316 (marqués au  $^{14}\text{C}$  sur la fonction cétone) et d'un système générateur d'électrons (NADPH) (53).

#### I.5.2.2. Aspects immunologiques des effets secondaires hépatotoxiques de l'acide tiénilique

Différents paramètres analysés après survenue d'une hépatite chez des patients ayant pris de l'acide tiénilique suggèrent un phénomène de type immuno-allergique (54) :

- fréquence rare (1 cas sur 10.000),
- période de sensibilisation,
- survenue de l'hépatite à la réadministration du médicament après un arrêt,
- pas de relation effet/dose apparente,
- présence dans le sérum de ces malades d'anticorps anti-LKM2 (41).

Une étude effectuée au laboratoire, en collaboration avec l'équipe du Pr. LEROUX (Hôpital Necker, Paris), a permis d'identifier l'antigène contre lequel semblent être dirigés ces anticorps anti-LKM2 (55). Des analyses par immuno-transfert ont montré que les sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 reconnaissent spécifiquement un cytochrome P-450 humain, présent dans les microsomes hépatiques, le cytochrome P-450-8 (IIC). D'autres cytochromes P-450 humains (P-450-5, P-450-9) ne sont pas reconnus par ces sérums, de même que des microsomes provenant de foie humain foetal connus pour leur absence de cytochrome P-450-8 (56). De plus, ces sérums contenant des anticorps anti-LKM2 inhibent l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique. L'activation métabolique in vitro de l'acide tiénilique ou de son isomère, avec fixation covalente sur les protéines hépatiques, est également inhibée par ces sérums.

Ces résultats suggèrent qu'un cytochrome P-450 responsable de l'activation métabolique d'un médicament peut, sous l'influence de ce médicament (ou de ses métabolites), devenir antigénique et induire la formation d'auto-anticorps.

## I.6. MOTIVATION DU TRAVAIL

### I.6.1. PROBLEME

A partir de quelques données de la littérature concernant l'hépatite de type immuno-allergique à l'halothane et des éléments que nous venons de décrire au sujet de l'hépatite à l'acide tiénilique, nous pouvons proposer un mécanisme hypothétique dans le cas de ce dernier médicament.

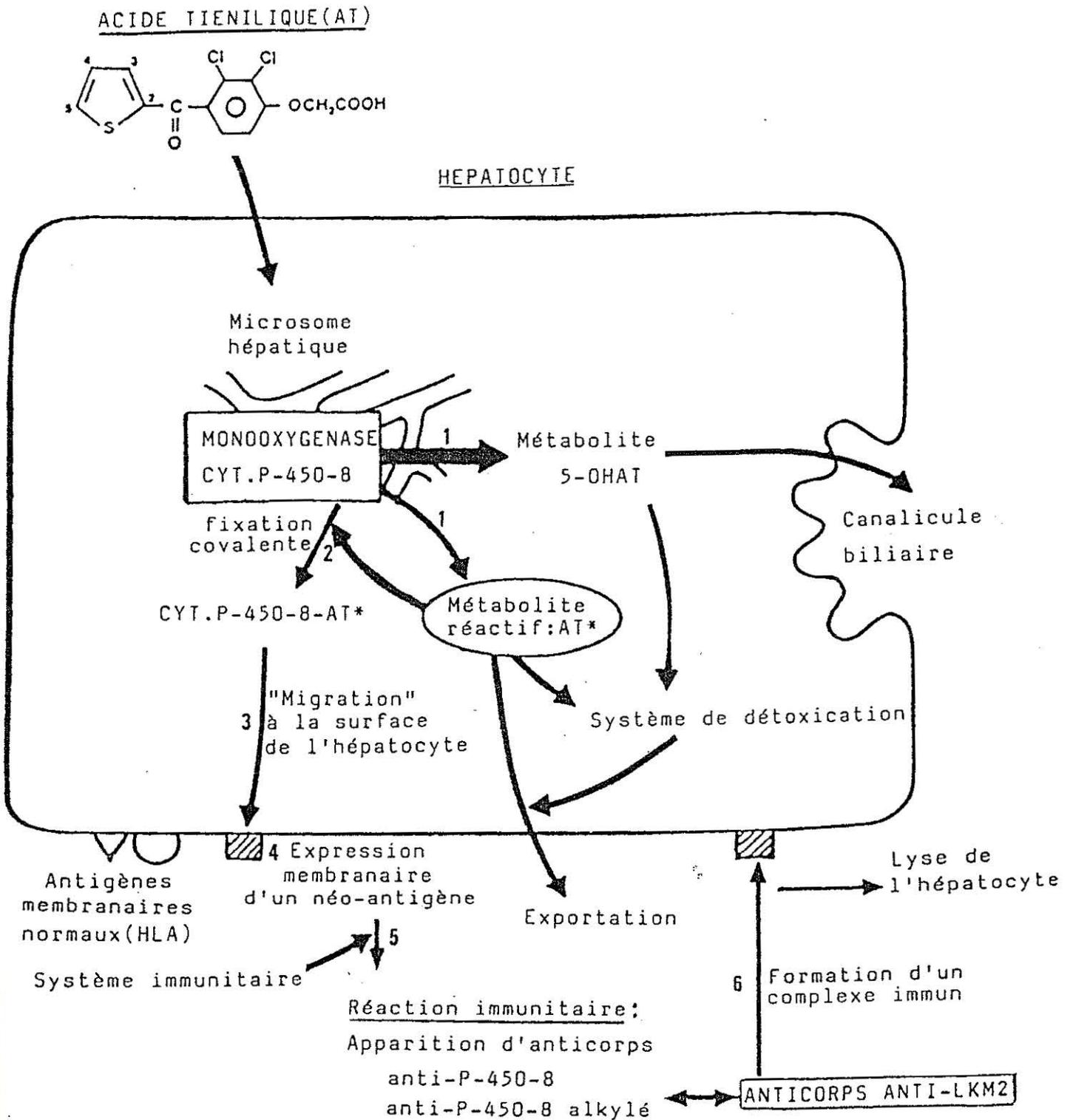
La figure 12 représente l'adaptation d'un schéma général, tiré de la revue de CALMUS et coll. (8), au cas particulier de l'acide tiénilique. Ce mécanisme comporterait 6 étapes :

1. Activation métabolique de l'acide tiénilique :
  - formation d'un métabolite stable,
  - formation de métabolites réactifs.
2. Fixation covalente des métabolites réactifs sur les protéines hépatiques dont les cytochromes P-450.
3. Migration d'une protéine (éventuellement alkylée) à la surface de l'hépatocyte.
4. Expression membranaire d'un néo-antigène.
5. Intervention du système immunitaire avec formation d'anticorps anti-LKM2.
6. Formation d'un complexe immun avec lyse hépatocyttaire.

### I.6.2. STRATEGIE SUIVIE

Au début de cette étude, nous possédions les informations ci-après relatives aux différentes étapes représentées sur la figure 12.

Fig. 12 : Mécanisme postulé pour l'apparition d'anticorps anti-LKM2.



Etape 1 : L'hydroxylation en position 5 de l'acide tiénilique par le cytochrome P-450-8 présent dans le foie humain a été montrée.

Etape 2 : Au cours de l'activation métabolique de l'acide tiénilique, la formation et la fixation de métabolites réactifs sur les protéines hépatiques ont été observées.

Etape 5 : Les anticorps anti-LKM2 détectés dans le sérum des patients ayant fait un accident hépatique sont spécifiquement dirigés contre une protéine hépatique, le cytochrome P-450-8.

Afin d'obtenir des informations sur les étapes 3 et 4, il fallait disposer d'un modèle animal. Pour pouvoir suivre l'apparition d'éventuels néo-antigènes, reconnus par les anticorps anti-LKM2, à la surface d'hépatocytes de rats traités par l'acide tiénilique, il était, dans un premier temps, nécessaire de mieux comprendre la reconnaissance des constituants hépatiques de rat par ces anticorps humains. Cette réactivité croisée existe puisqu'elle est à la base du test de détection des anticorps anti-LKM2. Ceci nous a amenée à répondre successivement à deux questions :

1. Que reconnaissent les anticorps anti-LKM2 sur les coupes de foie de rat ? En d'autres termes, comment peut-on expliquer le test de détection de ces auto-anticorps pratiqué par le Pr. HOMBERG ?

Cette question fera l'objet du chapitre III avec trois approches différentes :

- utilisation de la technique d'immuno-transfert pour déterminer ce que reconnaissent les anticorps anti-LKM2 dans les microsomes hépatiques de rats différemment traités ;
- capacité des anticorps anti-LKM2 à inhiber l'activation métabolique de l'acide tiénilique ou de son isomère par des microsomes hépatiques de rat ;

- degré de reconnaissance, par immunofluorescence indirecte, des anticorps anti-LKM2 sur des coupes de foie de rats différemment prétraités.

2. Y a-t-il apparition d'un nouvel antigène à la surface d'hépatocytes de rats après traitement par l'acide tiénilique ou son isomère avec, éventuellement, une induction préalable ?

Cette question sera abordée dans le chapitre IV à l'aide d'un test en immunofluorescence utilisant des hépatocytes de rats différemment traités et des anticorps anti-LKM2 ou des anticorps anti-acide tiénilique préparés chez le lapin (dans le cas de la présence d'une protéine hapténisée par un dérivé de l'acide tiénilique).

La dernière partie de ce travail porte sur un thème différent. Peut-on généraliser ce type de mécanisme à un autre médicament, l'iproniazide (Marsilid\*), conduisant également à une hépatite de type immuno-allergique ? Les anticorps anti-tissus détectés dans le sérum des patients ayant fait une hépatite après prise d'iproniazide sont des anticorps anti-mitochondries (anti-M6). Le but du chapitre V est d'essayer de déterminer la nature du (ou des) constituant(s) de la mitochondrie reconnu(s) par ces anticorps anti-M6 (42).

## CHAPITRE II

# MATERIELS ET METHODES

## II.1. MATÉRIELS

### II.1.1. PRODUITS CHIMIQUES

L'acide tiénilique et son isomère, le CRE 4316, nous ont été donnés par les Laboratoires Anphar Rolland. Ces produits ont été marqués au  $^{14}\text{C}$  sur le groupement cétone (5 et 25 Ci/mole) par le CEA (France) pour l'acide tiénilique (57) et par Amersham pour le CRE 4316.

Les réactifs d'électrophorèse ont été achetés chez SERVA, les feuilles de nitrocellulose chez Bio-Rad, les immunoglobulines conjuguées à la peroxydase chez DAKO, celles conjuguées à la fluorescéine chez Diagnostics Pasteur. Les marqueurs de poids moléculaire pour électrophorèse (phosphorylase B 94 kd, albumine sérique bovine 67 kd, ovalbumine 43 kd) proviennent de chez LKB, les adjuvants de Freund de chez Gibco, la protéine A (Ultrogel) de chez IBF (RP), la polylysine (P 1524) de chez Sigma.

La pargyline tritiée (23 Ci/mmole) a été achetée ainsi que l'Enlightning chez NEN (Boston, USA) et la tyramine marquée au  $^{14}\text{C}$  (1 mCi/mmole) chez Amersham.

Le déprényl et la clorgyline proviennent des Laboratoires Fournier.

Les autres réactifs utilisés sont de la meilleure qualité commercialement disponible.

### II.1.2. ANIMAUX

Des rats mâles de souche Sprague Dawley (Iffa Credo, 69 - L'Arbresle) pesant environ 200 g ont été utilisés pour les différentes études. Les animaux, répartis de façon aléatoire par cage, ont été hébergés en caissons avec renouvellement

d'air filtré, à une température constante, dans des conditions hygrométriques stables et un éclairage de rythme nyctéméral. La nourriture (A04, UAR, 91 - Epinay sur Orge) et l'eau de boisson ont été données ad libitum.

Des lapins "Fauve de Bourgogne" ont été employés dans les expériences d'obtention d'anticorps.

### II.1.3. TRAITEMENTS

Les rats après une période de stabilisation de 10 jours, ont été traités pendant 3 jours par injection péritonéale de différents produits aux doses indiquées.

Produits	Dose mg/kg/j	Solution injectée (1 ml)
- Phénobarbital (PB)	80	20 mg/ml en solution saline NaCl 0,9 %
- $\beta$ -naphtoflavone (BNF)	50	12,5 mg/ml dans l'huile de maïs
- Cyano-16 $\alpha$ -pregnenolone (PCN)	50	12,5 mg/ml dans l'huile de maïs
- Méthyl-3 cholanthrène (3MC)	25	6,25 mg/ml dans l'huile de maïs
- Triacétate d'oléandromycine (TAO)	500	125 mg/ml en suspension dans l'huile de maïs
- Fénofibrate (FEN)	500	solution à 10 % en volume dans l'huile de maïs
- Clofibrate (CLO)	500	solution à 10 % en volume dans l'huile de maïs
- Acide tiénilique (AT)	100	25 mg/ml dans un tampon Tris 85 mM
- CRE 4316	100	25 mg/ml dans un tampon Tris 85 mM

Le traitement clofibrate, puis acide tiénilique, a été réalisé par 3 injections de clofibrate (500 mg/kg/j ; J<sub>1,2,3</sub>) 1 injection d'acide tiénilique (100 mg/kg; J<sub>4</sub>) avant sacrifice à J<sub>5</sub>.

A la fin du traitement, après une nuit de jeûne, les rats sont tués par dislocation cervicale et saignés, par section de la carotide. Le foie et le rein éventuellement sont prélevés.

Dans le cas d'obtention d'hépatocytes isolés, les rats sont endormis par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique à 6 % (30 mg/kg) avant perfusion du foie.

#### II.1.4. SERUMS

Les sérums de patients atteints d'hépatite après prise d'acide tiénilique et contenant des anticorps anti-LKM2 (JOR, CAI, TAY, KUT, PLA) nous ont été donnés par le Pr. HOMBERG (Hôpital Saint Antoine, Paris), ainsi que ceux de patients atteints d'hépatite à l'iproniazide et contenant des anticorps anti-M6 (BIM, JAC). Des sérums humains témoins (ne contenant pas d'auto-anticorps) ont été utilisés.

Des sérums de lapin contenant des anticorps polyclonaux contre diverses formes purifiées de cytochromes P-450 hépatiques de rat nous ont été donnés par le Dr R.C. WOLF (Edimbourg, Ecosse).

Le Dr. E.E. BILLET (Nottingham, Grande Bretagne) nous a fourni des anticorps polyclonaux de mouton et monoclonaux de souris dirigés contre la monoamine oxydase B de foie humain.

#### II.1.5. CYTOCHROMES P-450 PURIFIES DE FOIE DE RAT

Les cytochromes P-450 purifiés de foie de rat proviennent du Laboratoire du Dr R.C. WOLF (Edimbourg, Ecosse).

### II.1.6. FOIES HUMAINS

Les foies humains nécessaires à la préparation de microsomes ont été prélevés après mort accidentelle et congelés. Les foies de sujets normaux (H97, H96, H86) nous ont été donnés par le Pr. BEAUNE (Hôpital Necker, Paris), le foie d'un sujet hydroxylateur lent pour la méphénytoïne (KDL) par le Pr URS MEYER (Bâle, Suisse) et les foies foetaux (F 135, F 139) par le Dr CRESTEIL (Hôpital Necker, Paris).

### II.2. ÉTUDES BIOCHIMIQUES

#### II.2.1. MICROSOMES

##### II.2.1.1. Préparation des microsomes

A partir des foies humains ou de rat, des microsomes ont été préparés par centrifugations différentielles selon le protocole suivant (58) :

- a) Foie perfusé par NaCl 0,154 M jusqu'à décoloration (élimination de l'hémoglobine), découpé en dés dans du tampon Tris 0,1 M contenant 0,2 M sucrose et 1 mM EDTA, pH = 7,4, broyé à l'Ultra-Turrax dans le cas de foie humain ~~congelé~~, homogénéisé dans un appareil de Potter-Elvehjem (20 à 40 g de foie pour 100 ml de tampon) et centrifugé 10 min à 800 g (précipitation des noyaux et débris cellulaires).
- b) Surnageant centrifugé 20 min à 13500 g (précipitation des mitochondries).  
*Lymito,*
- c) Surnageant centrifugé 60 min à 100.000 g (précipitation du glycogène et des microsomes, le surnageant contenant le cytosol).

d) Culot homogénéisé dans un tampon de diphosphate de tétra-sodium (pyrophosphate de sodium) 0,1 M, pH = 7,5, puis centrifugé 30 min à 100.000 g (élimination de l'hémoglobine soluble dans ce tampon).

e) Culot homogénéisé dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M contenant 20 % de glycérol, pH = 7,4.

Toutes ces manipulations sont effectuées à 4°C, les microsomes obtenus sont congelés immédiatement dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

#### II.2.1.2. Dosages effectués sur les microsomes

##### II.2.1.2.1. Dosage du cytochrome P-450

Toutes les mesures spectrophotométriques ont été effectuées sur un spectrophotomètre KONTRON 820 possédant une sphère de diffusion et en utilisant des cuves à bords noirs afin de diminuer la diffusion de la lumière par la suspension microsomale.

Deux dosages sont immédiatement effectués sur la préparation microsomale diluée dans un tampon phosphate 0,1 M contenant 0,1M EDTA, pH = 7,4. Le cytochrome b5 est dosé par spectroscopie UV-visible différentielle entre la suspension microsomale réduite par quelques grains de dithionite de sodium (cuve échantillon) et la suspension microsomale non traitée ( $\epsilon$  427-410 nm = 181 cm<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>).

La concentration des microsomes en cytochromes P-450 est déterminée par la méthode de OMURA et SATO (59) : les hémoprotéines contenues dans les deux cuves sont réduites par addition de quelques grains de dithionite de sodium et la cuve échantillon est saturée en monoxyde de carbone par barbotage ( $\epsilon$  450-490 nm = 91 cm<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>).

#### II.2.1.2.2. Dosage des protéines

La concentration en protéines des microsomes préparés a été déterminée par la méthode de LOWRY (60). Cette méthode colorimétrique utilise l'albumine sérique bovine comme standard. La densité optique est lue à 546 nm.

#### II.2.2. MITOCHONDRIES

##### II.2.2.1. Préparation des mitochondries

Des mitochondries sont préparées à partir du foie humain H97. La méthode de préparation est identique à celle des microsomes jusqu'à l'étape b) et se poursuit selon le protocole ci-après :

c) Culot homogénéisé dans un tampon Hépès 5 mM contenant 0,5 mM EDTA et 0,25 M saccharose, pH = 7,5, puis centrifugé 15 min à 500 g.

d) Surnageant centrifugé 15 min à 15.000 g.

e) Culot homogénéisé dans le tampon de l'étape c) puis centrifugé 15 min à 13.000 g.

f) Culot homogénéisé dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M contenant 20 % glycérol, pH = 7,4.

Toutes ces manipulations sont effectuées à 4°C, les mitochondries obtenues sont immédiatement congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Des mitochondries ont été également préparées à partir d'un placenta humain frais provenant de la maternité de Baude-locque (Paris), selon une méthode décrite (61).

Après élimination du cordon ombilical, du sac amniotique et du tissu conjonctif, le placenta est rincé par du tampon phosphate (PBS), pH = 7,4.

a) Découpé, broyé dans un Waring Blendor, homogénéisé à l'Ultra-Turrax dans un tampon phosphate 10 mM contenant 0,25 M sucrose, 0,5 mM EDTA et 0,5 mM fluorure de phénylméthyl sulfoxyde, pH = 7,2, filtré sur une gaze, puis centrifugé 15 min à 1250 g.

b) Surnageant centrifugé 15 min à 26.000 g.

c) Culot homogénéisé dans un appareil de Potter-Elvehjem dans le tampon de a) puis centrifugé 15 min à 26.000 g ;

d) Culot homogénéisé dans un tampon Tris 10 mM contenant 0,15 M KCl, 0,5 mM EDTA, pH = 7,2 puis centrifugé 20 min à 40.000 g.

e) Culot homogénéisé dans un tampon phosphate 0,1 M contenant 20 % glycérol, pH = 7,4.

Toutes les manipulations sont effectuées à 4°C. Les mitochondries après congélation dans l'azote liquide sont conservées à -80°C.

#### II.2.2.2. Marquage des mitochondries à la pargyline tritiée

Les mitochondries obtenues à partir de foie ou de placenta humains (325 µg de protéines mitochondriales dans un volume final de 50 µl complété par du tampon phosphate 0,1 M, pH = 7,4) sont incubées en présence de 0,9 µM de pargyline tritiée (23 Ci/mmole) pendant 1 h à 37°C.

Une inhibition spécifique du marquage à la pargyline des monoamine oxydases A ou B est réalisée par une incubation

préalable des mitochondries en présence de 1,5  $\mu$ M de clorgyline ou de déprenyl pendant 1 h à 37°C (62).

### II.2.2.3. Immunoprécipitation de la fraction mitochondriale marquée à la pargyline tritiée par des sérums humains

La suspension mitochondriale de foie ou de placenta humains marquée à la pargyline est centrifugée 5 min à 12.000 g (centrifugeuse Eppendorf, Sigma). Le culot est lavé 5 fois par du tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH = 7,4 afin d'éliminer la pargyline non fixée. Le culot final obtenu est solubilisé par un tampon phosphate 0,1 M, pH = 7,4 contenant 1 % CHAPS et 0,4 % Triton. Une centrifugation à 12.000 g pendant 3 min permet d'éliminer les mitochondries non solubilisées et d'obtenir une solution mitochondriale homogène à une concentration d'environ 6  $\mu$ g de protéines/ $\mu$ l.

Différentes quantités de cette solution mitochondriale (10 à 70  $\mu$ l), complétées à 100  $\mu$ l par du tampon phosphate 0,1 M pH = 7,4 sont incubées pendant 1 h à température ambiante en présence de 50  $\mu$ l de sérum humain témoin ou contenant des anticorps anti-M6 (JAC, BIM) dilués au 1/200, 1/100 ou 1/50<sup>e</sup>. Sont ajoutés ensuite 50  $\mu$ l d'une suspension de protéine A (Ultrogel au 1/2,5<sup>e</sup> dans le tampon phosphate 0,1 M, pH = 7,4 par rapport à la suspension commerciale) et laissés incubés pendant 1 h à température ambiante. Le mélange est alors centrifugé 5 min à 12.000 g :

- Le surnageant obtenu est déposé sur filtre de verre. Les protéines sont précipitées par immersion du filtre 20 min dans une solution d'acide trichloracétique à 15 %. Les filtres sont ensuite rincés deux fois 10 min dans du méthanol et une fois 10 min dans de l'acétate d'éthyle; La radioactivité des filtres séchés est quantifiée dans un compteur à scintillation Packard Tricarb 300 après addition de 2 ml de toluène scintillant.

Le culot est lavé par du tampon phosphate 0,1 M, pH = 7,4 puis solubilisé par 100 µl NaOH 1M. La radioactivité est comptée après addition de Picofluor.

#### II.2.2.4. Mesure de l'activité oxydante des monoamine oxydases

L'activité enzymatique des MAO est mesurée dans le surnageant obtenu après immunoprécipitation à partir de 240 µg de protéines mitochondriales par les différents sérums. Pendant 15 min, 50 µl de ce surnageant sont incubés à 37°C en présence de 45 µM de chlorhydrate de tyramine marquée au <sup>14</sup>C (1 mCi/mmmole) dans un volume final de 220 µl complété par du tampon phosphate 0,1 M, pH = 7,4. Le produit d'oxydation est extrait par 3 ml d'un mélange acétate d'éthyle/toluène (v/v). La radioactivité est comptée dans la phase organique après addition de 10 ml de toluène scintillant.

#### II.2.3. FIXATION COVALENTE DE L'ACIDE TIENILIQUE OU DE SON ISOMERE SUR LES PROTEINES MICROSOMALES

Les microsomes de foie humain ou de rat (0,2 nmole P-450) sont mis en suspension dans 100 µl de tampon phosphate 0,1 M, pH = 7,4. Les incubations de 150 µl sont initiées par addition d'un système générant du NADPH (10 mM glucose-6-phosphate, 1 mM NADP, 2UI/ml glucose-6-phosphate déshydrogénase) et du substrat (100 µM acide tiénilique ou CRE 4316 marqués au <sup>14</sup>C). Après 20 min à 37°C, 50 µl d'incubat sont prélevés et déposés sur filtre de verre Whatman GFA 20 mm (6'3). Les protéines sont précipitées par immersion du filtre 20 min dans une solution d'acide trichloracétique à 15 %. Les filtres sont ensuite rincés 2 fois 10 min dans du méthanol et une fois 10 min dans de l'acétate d'éthyle. La radioactivité des filtres séchés est quantifiée dans un compteur à scintillation Packard Tricarb 300 après addition de 2 ml de toluène scintillant.

Les effets des anticorps sur cette fixation covalente sont étudiés après préincubation des microsomes en présence de sérum pendant 20 min à 0°C.

#### II.2.4. ELECTROPHORESE ET IMMUNO-TRANSFERT

Les électrophorèses de protéines sur gel SDS/polyacrylamide ont été réalisées selon la méthode de LAEMMLI (64) dans des cuves LKB contenant un tampon de migration.

Les protéines (microsomes, cytochromes P-450 purifiés, mitochondries) sont tout d'abord dénaturées par un mélange de  $\beta$ -mercapto-éthanol et de sodium dodécyl sulfate (SDS) (solution de dénaturation des protéines) et par chauffage 2 min à 100°C avant d'être déposées (5 à 20  $\mu$ g de protéines/puits) sur un gel discontinu de SDS/polyacrylamide. Le gel de migration est à 9 % en polyacrylamide et celui de compression à 4,5 % (gels de migration et de compression). Un courant de 20 mA/gel est appliqué jusqu'à ce que les protéines atteignent le gel de migration. L'intensité est alors augmentée à 40 mA/gel.

Les protéines séparées par électrophorèse sont ensuite soit colorées au bleu de Coomassie, soit transférées sur feuille de nitrocellulose (65) dans un tampon de transfert.

Les protéines transférées sont colorées de façon fugitive au Rouge Ponceau S. Les feuilles de nitrocellulose sont ensuite saturées pendant 10 min à 37°C par une solution de saturation contenant de la BSA et du sérum de veau foetal. Puis le sérum à tester (dilué au 1/100<sup>e</sup> en général dans la solution de saturation) est incubé en présence des feuilles de nitrocellulose pendant 30 min à 37°C et une nuit à 4°C. Après 6 lavages de 5 min par du tampon PBS contenant du Tween (PBS Tween), des immunoglobulines marquées à la peroxydase

(diluées dans du tampon PBS au 1/100<sup>e</sup> à 1/500<sup>e</sup> suivant les cas) sont ajoutées pendant 30 min à température ambiante. La révélation des anticorps fixés est réalisée, après 6 lavages de 5 min par du tampon PBS, par une solution de tétrachlorure de diamino-3,3' benzidine (Sigma) contenant de l'eau oxygénée et des sels de chlorure de nickel et de cobalt (solution de révélation)(66).

Tampons d'électrophorèse et d'immuno-transfert

- Tampon de migration

- Glycine	115,2 g	
- Tris	24,2 g	à diluer au 1/4
- SDS	8,0 g	
- H <sub>2</sub> O	2,0 l	

- Solution de dénaturation des protéines

- Glycérol 60 % dans H <sub>2</sub> O	5,0 ml	} 1 mg de protéines est solubilisé: dans 250 µl de cette solution
- Tris 2M, pH = 6,8	1,0 ml	
- SDS 10 % dans H <sub>2</sub> O	3,0 ml	
- Pyronine 0,5 % dans H <sub>2</sub> O	0,2 ml	
- H <sub>2</sub> O	0,8 ml	
- β-Mercapto-éthanol	1,5 ml	

- Gel de migration

- Acrylamide	22,0 g	} 16 ml
- Bis-acrylamide	0,6 g	
- H <sub>2</sub> O qsp	100,0 ml	
- Temed 1 % dans H <sub>2</sub> O		1,2 ml
- Persulfate NH <sub>4</sub> 1 % dans H <sub>2</sub> O		1,7 ml
- Tris 0,75 M, pH = 8,8		1,9 ml
- SDS 2 % dans H <sub>2</sub> O		2,0 ml

- Gel de compression

- Acrylamide/bis-acrylamide 1,4 ml  
(solution identique à celle du gel de migration)
- Temed 1 % 0,5 ml
- Persulfate  $\text{NH}_4$  1 % 0,4 ml
- Tris 0,25 %, pH = 6,8 5,0 ml
- SDS 2% 0,5 ml
- Saccharose 1,0 g

- Bleu de Coomassie

- Bleu de Coomassie 200 mg
  - Acide acétique 10 ml
  - Ethanol 45 ml
  - $\text{H}_2\text{O}$  45 ml
- } coloration pendant 30 min  
puis décoloration par  
une solution méthanol-  
acide acétique (v/v)  
diluée au 1/5è dans  $\text{H}_2\text{O}$

- Tampon de transfert

- Glycine 43,2 g
- Tris 9,1 g
- $\text{H}_2\text{O}$  2400,0 ml
- Méthanol 600,0 ml

- Rouge Ponceau S

- Rouge Ponceau S 0,2 g
- Acide trichloracétique 3,0 g
- $\text{H}_2\text{O}$  100,0 ml

- Tampons PBS/PBS Tween

- NaCl 40,0 g
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 g
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  14,5 g
  - KCl 1,0 g
  - $\text{H}_2\text{O}$  5,0 l
- } + Tween 20 2,5 ml

- Solution de saturation

- BSA 3,0 g
- Sérum de veau foetal 10,0 ml
- PBS Tween 90,0 ml

- Solution de révélation

- Tétrachlorure de diamino-3,3'	
benzidine	50,0 mg
- Cl <sub>2</sub> Co,6H <sub>2</sub> O	7,5 mg
- Cl <sub>2</sub> Ni,6H <sub>2</sub> O	7,5 mg
- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	10,0 µl
- PBS	50,0 ml

II.2.5. FLUOROGRAPHIE

Afin de visualiser les protéines mitochondriales marquées à la pargyline tritiée, une fluorographie est réalisée à partir des gels d'électrophorèse colorés au bleu de Coomassie. Ces gels sont incubés pendant 30 min en présence d'Enlightning (solution commerciale) puis séchés et mis au contact d'un film photographie KODAK (X-OMAT) pendant 3 semaines. Le film est alors révélé (Révélateur LX 24 KODAK), puis fixé (Fixateur AL4, KODAK).

II.3. ÉTUDES IMMUNOLOGIQUES

II.3.1. IMMUNISATION D'ANIMAUX

II.3.1.1. Préparation de protéines hapténisées par l'acide tiénilique

Afin d'obtenir des anticorps anti-haptène, ici, anti-acide tiénilique, l'acide tiénilique a été couplé à des protéines porteuses (BSA ou Caséine) selon une méthode décrite (67). Dans 2,85 ml de dioxane, sont dissous 100 mg (0,3 mmole) d'acide tiénilique froid auxquels sont ajoutés 20 µl d'une solution 10 mM d'acide tiénilique marqué au <sup>14</sup>C (5 µCi/µmole) et 0,07 ml de tri-n-butylamine. La solution est refroidie à -10°C et 0,04 ml de chlorocarbonate d'isobutyl est ajouté. La réaction se poursuit pendant 20 min à 4°C. L'addition d'une solution

homogène et refroidie, de 0,4 g de BSA (ou de Caséine) dans 20 ml H<sub>2</sub>O/dioxane (v/v) et 0,4 ml NaOH 1 N, est alors effectuée. Après 60 min, 0,19 ml de NaOH 1N est ajouté. L'agitation et le refroidissement sont poursuivis pendant 4 h. La solution obtenue est dialysée contre de l'eau pure pendant 48 h. Le précipité est recueilli par centrifugation.

Un comptage de la radioactivité et un spectre en UV permettent de vérifier que le couplage a été réalisé et de déterminer la quantité d'acide tiénilique fixée aux protéines.

Les solutions de BSA-AT et Caséine-AT ont respectivement pour concentration 1,7 et 2,1 mg/ml, et pour quantité de radioactivité 10.000 et 10.800 cpm/mg. La solution initiale d'acide tiénilique marqué étant de 33 cpm/nmole, le nombre de nmoles d'acide tiénilique fixées par mg de protéines est donc de 300 pour la BSA et de 324 pour la caséine. Ce résultat équivaut à 20,4 nmoles d'acide tiénilique fixées par nmole de BSA et à 39,2 par nmole de caséine.

#### II.3.1.2. Protocole d'immunisation des lapins

Des lapins "Fauve de Bourgogne" ont été immunisés par injections sous-cutanées au niveau dorsal de 1 mg de BSA-AT ou Caséine-AT en suspension dans 1 ml d'une solution sérum physiologique/adjuvant complet de Freund (v/v) pour la première injection, puis de façon identique, mais avec de l'adjuvant incomplet de Freund (pour les 5 rappels à 1 mois d'intervalle). Des prélèvements sanguins sont effectués 10 jours après chaque injection, au niveau de la veine externe de l'oreille.

#### II.3.2. TEST ELISA DES SERUMS DE LAPINS IMMUNISES

Il est déposé 100 µl d'une solution de BSA-AT ou Caséine-AT (5 à 20 µg/ml dans le tampon A) dans chaque puits d'une

*lavage 3x PBS Tween*

plaque de microtitration (NUNC, Réf. 4-68667), et incubés pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages par un tampon PBS Tween, les puits sont saturés pendant 60 min à 37°C par 200 µl d'une solution de 3 % gélatine dans du PBS Tween. Les sérums à tester (100 µl à différentes dilutions dans du PBS Tween) sont ajoutés pendant une nuit à 4°C. Trois lavages par du PBS Tween sont effectués. Sont ajoutés 100 µl d'immunoglobulines marquées à la peroxydase (diluées au 1/250<sup>e</sup> dans du tampon PBS) et incubés pendant 60 min à 37°C.

Après 3 lavages par du PBS, l'addition de 100 µl d'une solution contenant le substrat de la peroxydase (solution B) est réalisée pendant 20 min à 37°C.

Dans le cas d'une réaction positive (présence d'anticorps spécifiques dans le sérum), une coloration verte est développée. Elle sera quantifiée, après arrêt de la réaction par 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, par la mesure de densité optique à 490 nm effectuée par un lecteur automatique de plaques de microtitration (Titertek Multiskan).

- Tampons ELISA

- Tampon A

- Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g	}	pH = 9,6
- NaHCO <sub>3</sub>	2,30 g		
- NaN <sub>3</sub>	0,20 g		
- H <sub>2</sub> O	1,0 l		

- Solution B

- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,12 g	}	pH = 5,6
- Acide citrique	0,89 g		
- H <sub>2</sub> O	100,0 ml		
- ABTS (acide azino-2,2' di(éthyl-3' benzthiazoline sulfonique)	75,0 mg		
- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 %	200,0 µl		

### II.3.4. IMMUNOFLUORESCENCE SUR COUPES D'ORGANES

#### II.3.4.1. Préparation des coupes à congélation

Les foies et reins de rats ou de souris, traités ou non, sont prélevés, découpés en blocs de 0,25 cm<sup>3</sup> environ et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Ces blocs d'organes sont ensuite coupés à l'aide d'un cryostat en sections de 4 µm d'épaisseur déposées sur lames et conservés à -80°C.

#### II.3.4.2. Immunofluorescence sur coupes

Les sérums à tester (dilués en général au 1/20<sup>e</sup> dans du tampon PBS) sont incubés sur les coupes d'organes pendant 30 min à température ambiante et en atmosphère humide. Après trois lavages de 5 min par du tampon PBS, les immunoglobulines marquées à la fluorescéine sont ajoutées et laissées au contact des coupes pendant 30 min. Les lames sont ensuite rincées 3 fois par du tampon PBS. Une goutte de PBS contenant du glycérol (v/v) permet de déposer sur la coupe une lamelle de verre avant lecture des lames à l'aide d'un microscope optique Leitz équipé pour la fluorescence.

### II.3.5. HISTOLOGIE

#### II.3.5.1. Prélèvement histologique

Un fragment d'organe (foie, rein) prélevé chez l'animal est fixé dans une solution de Bouin, puis déshydraté par une série de bains successifs :

- Alcool 70°     2 h
- Alcool 95°    15 min
- Alcool 100°   3 x 10 min
- Toluène        2 x 15 min
- Paraffine      2 x 20 min

L'inclusion est effectuée dans la paraffine. Les blocs sont coupés à l'aide d'un microtome en sections de 4 µm d'épaisseur, déposés sur lames et séchés à l'étuve à 60°C.

#### II.3.5.2. Coloration à l'Azan de Heidenhain

Cette coloration associe l'azocarmin G, le bleu d'aniline et l'orange G. Les noyaux cellulaires sont colorés en rouge, les cytoplasmes en rouge ou jaune suivant leur pH, les fibres de collagène en rouge foncé, les structures riches en mucopolysaccharides acides en bleu clair et les fibres élastiques restent incolores.

Les lames sont déparaffinées par bains successifs dans du toluène, de l'alcool 100° puis 95° et 70° avant d'être rincées à l'eau. La coloration par la solution d'azocarmin G est réalisée pendant 30 min à 60°C. Les lames sont ensuite rincées à l'eau, différenciées par de l'alcool 70° contenant 1 % d'aniline et passées dans de l'alcool à 95° contenant 1 % d'acide acétique. Après rinçage, les coupes sont mises au contact d'une solution d'acide phosphotungstique à 5 % dans l'eau pendant 15 min. Les lames sont ensuite rincées et colorées par la solution de bleu d'Heidenhain pendant 15 min.

Après rinçage, les coupes sont déshydratées par des bains successifs d'alcool (70°, 95° puis 100°) et de toluène. Une lamelle de verre est placée sur la lame après dépôt d'une goutte de PBS contenant du glycérol (v/v).

#### - Solutions de coloration

##### - Solution d'azocarmin G

- Azocarmin G	0,1 g	} chauffage à 60°C
- Acide acétique	2,0 ml	
- H <sub>2</sub> O	100,0 ml	

- Bleu de Heidenhain

- |                    |          |   |
|--------------------|----------|---|
| - Bleu d'aniline   | 0,5 g    | } dissolution à chaud, puis<br>addition de 8 ml d'acide<br>acétique |
| - Orange G         | 2,0 g    |   |
| - H <sub>2</sub> O | 100,0 ml |   |

II.3.6. IMMUNOFLUORESCENCE SUR HEPATOCYTES ISOLES

II.3.6.1. Obtention des hépatocytes

Les hépatocytes de rats (témoins ou traités) sont isolés suivant la méthode de SEGLEN (68). Après anesthésie par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique à 6 % (30 mg/kg), l'abdomen est incisé, les veines cave et porte (respectivement l'entrée et la sortie des liquides de perfusion) sont dégagées, des ligatures posées et le système veineux sus-hépatique clampé après avoir posé le cathéter au niveau de la veine cave et incisé la veine porte. Le foie est alors perfusé 5 min par 250 ml de tampon Krebs sans calcium et contenant du glucose (tampon de rinçage) à un débit de 30 à 50 ml/min sous oxygénation à 37°C, afin d'éliminer une grande partie de l'hémoglobine.

Puis le foie est perfusé par une solution de collagénase à 37°C, qui est recyclée pendant 30 min. Au terme de cette étape, le foie est prélevé, les cellules sont dissociées à l'aide d'une peigne fin dans la solution de collagénase puis filtrées sur toile de nylon. Une première centrifugation à 50 g est effectuée pendant 2 min dans du tampon Krebs sans calcium. Une filtration et deux centrifugations successives à 50 g permettent d'obtenir un culot cellulaire propre.

Les hépatocytes sont comptés en cellule de Malassez et leur viabilité est déterminée par le test d'exclusion au bleu Trypan :

$$100 - \frac{\text{cellules mortes}}{\text{cellules totales}} \times 100 = \% \text{ viabilité}$$

- Tampons de perfusion

- Tampon Krebs sans calcium

- NaCl	121,0 mM	} pH = 7,4
- KCl	4,85 mM	
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,22 mM	
- MgSO <sub>4</sub>	1,22 mM	
- NaHCO <sub>3</sub>	25,50 mM	

- Tampon de rinçage

- Krebs sans calcium 250 ml
- Glucose 500 mg

- Solution de collagénase

- Tampon Krebs sans calcium 100 ml
- Glucose 360 mg
- Collagénase 50 mg (à 0,27 U/mg)

II.3.6.2. Test d'immunofluorescence

II.3.6.2.1. Cellules fixées

Des lames d'immunofluorescence à 18 puits sont traitées à la polylysine (0,5 mg/ml) pendant 30 min, le liquide est aspiré et les lames sont stockées à -20°C, prêtes à l'emploi.

Les cellules isolées sont disposées dans chaque puits (10 µl d'une suspension à 4.10<sup>6</sup> cellules/ml). Elles adhèrent pendant 2 h puis sont fixées par une solution de paraformaldéhyde 4 % et de glutaraldéhyde 0,01 % dans du tampon PBS pendant 20 min. Trois rinçages par du tampon PBS sont effectués, dont un en présence de glycine 0,1 M. Les sites non spécifiques sont saturés par une solution BSA 4 % dans un tampon PBS pendant 30 min, puis le sérum à tester (dilué au 1/25è) est ajouté pendant 60 min. Après lavages, les immuno-

globulines marquées à la fluorescéine (diluées au 1/100è dans du tampon PBS) sont incubées pendant 60 min. Les lames sont ensuite rincées et une lamelle de verre est déposée après addition d'une goutte de tampon PBS contenant de la glycérine (v/v). L'observation est alors effectuée à l'aide d'un microscope optique Olympus équipé pour la fluorescence.

#### II.3.6.2.2. Cellules non fixées

Dans ce cas, les mêmes étapes que précédemment sont réalisées (à l'exclusion de la fixation) mais en suspension dans des tubes Eppendorf. Après la dernière incubation, un frottis du culot d'hépatocytes est effectué sur lames de verre.

## CHAPITRE III

Etude de la capacité de  
reconnaissance des anticorps anti-  
LKM2 vis à vis des microsomes  
hépatiques de rat

## OBJECTIFS

Ce chapitre devrait permettre de répondre à la première question posée, à savoir que reconnaissent les anticorps anti-LKM2 au niveau des microsomes hépatiques de rat. Cette réactivité croisée entre antigènes de rat et anticorps humains est la clé des études ultérieures explorant le mécanisme d'apparition des anticorps anti-LKM2.

### III.1. DÉTERMINATION PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNO-TRANSFERT, DES CONSTITUANTS MICROSOMAUx HÉPATIQUES DE RAT RECONNUS PAR LES ANTICORPS ANTI-LKM2.

Nous allons, dans cette première partie, essayer de déterminer par la technique d'immuno-transfert ce que reconnaissent les anticorps anti-LKM2 dans les microsomes hépatiques de rat. Des comparaisons seront réalisées à la fois par rapport à des microsomes de foie humain et aussi par rapport à des anticorps anti-cytochromes P-450 de rat obtenus par immunisation de lapins à l'aide des protéines purifiées.

#### III.1.1. SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES MICROSOMALES HEPATIQUES

##### III.1.1.1. Protéines microsomales de foie humain

Avant d'immunorévéler les protéines microsomales de foie humain avec différents sérums, il était nécessaire de pouvoir visualiser leur profil après électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les protéines de diverses préparations microsomales de foie humain ont été séparées par électrophorèse. Nous avons utilisé des microsomes de foie humain de sujets normaux (H97, H86) à titre de référence. Le Pr. URS MEYER (Bâle, Suisse) nous ayant

donné un foie de sujet hydroxylateur lent pour la méphénytoïne, des microsomes de ce foie ont été préparés (KDL). Les anticorps anti-LKM2 étant dirigés contre un cytochrome P-450 humain (cytochrome P-450-8) présentant une activité méphénytoïne hydroxylase, il était intéressant de voir si des différences pouvaient être observées entre sujet normal et sujet hydroxylateur lent aussi bien au niveau du profil électrophorétique que reconnaissance par les sérums.

Des microsomes de foie humain foetal (F135) nous ont été donnés par le Dr T. CRESTEIL (Hôpital Necker, Paris) et ont été utilisés du fait de l'absence de cytochrome P-450-8 chez le foetus (56).

La figure 13 montre le profil électrophorétique de ces différentes préparations microsomales hépatiques.

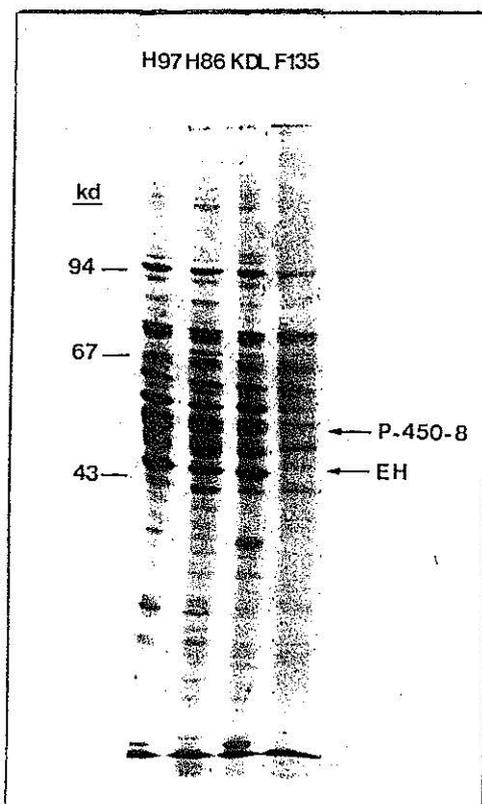
La répartition protéique des différents microsomes de foie adulte (H97, H86, KDL) est très analogue. Aucune différence électrophorétique n'apparaît entre les microsomes hépatiques de sujets normaux et de sujet hydroxylateur lent pour la méphénytoïne.

Si l'on compare maintenant le profil électrophorétique des microsomes de foie adulte aux microsomes de foie foetal, deux protéines présentes chez l'adulte sont absentes chez le foetus. Il s'agit du cytochrome P-450-8 (environ 53 kd) et de l'époxyde hydrolase (EH, environ 47 kd), comme ceci avait été décrit par T. CRESTEIL et coll. (56).

#### III.1.1.2. Protéines microsomales hépatiques de rat

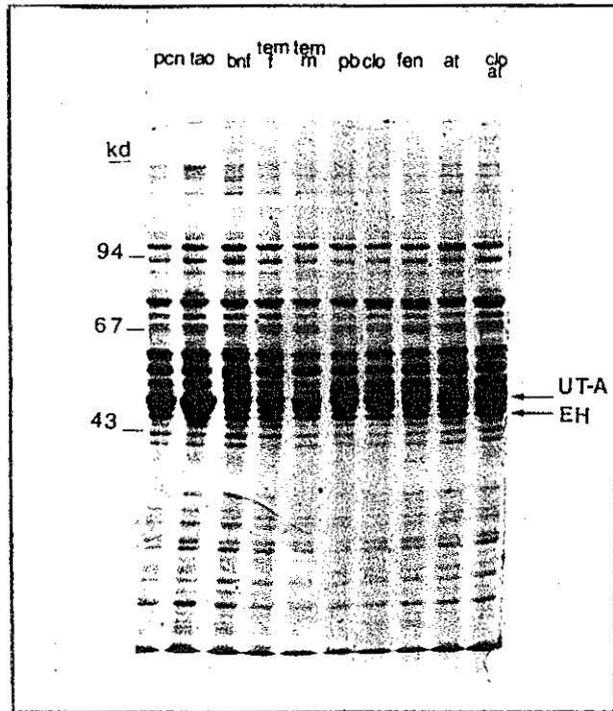
Un traitement des rats par des inducteurs hépatiques classiques ou par des médicaments modifie de façon importante la répartition (proportion et type) des cytochromes P-450 hépatiques par rapport à celle de rats non traités. Ce phénomène est décrit dans la figure 14.

Fig. 13 : Migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide de protéines microsomales de différents foies humains.



Electrophorèse sur gel SDS/polyacrylamide (9 %) de 12  $\mu$ g .  
de chaque fraction microsomale de foie humain de sujets  
normaux (H97, H86), d'un sujet hydroxylateur lent pour la  
méphénytoïne (KDL) et d'un fœtus (F135).  
Coloration au bleu de Coomassie.

Fig. 14 : Migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide de protéines microsomales hépatiques de rats traités par différents inducteurs.



Electrophorèse sur gel de SDS/polyacrylamide (9 %) de 16 µg de chaque fraction microsomale hépatique de rats non traités mâles (tem m) ou femelles (tem f) ou de rats traités par PB, CLO, FEN, AT, CLO-AT, BNF, TAO et PCN (pb, clo, fen, at, cloat, bnf, tao, pcn). Coloration au bleu de Coomassie.

Des protéines microsomales hépatiques de rats traités par différents inducteurs (PB, CLO, FEN, BNF, TAO, PCN) ou par l'acide tiénilique (AT, CLO-AT), ont été séparées par électrophorèse comparativement à des protéines microsomales hépatiques de rats non traités mâles ou femelles (tem m, tem f).

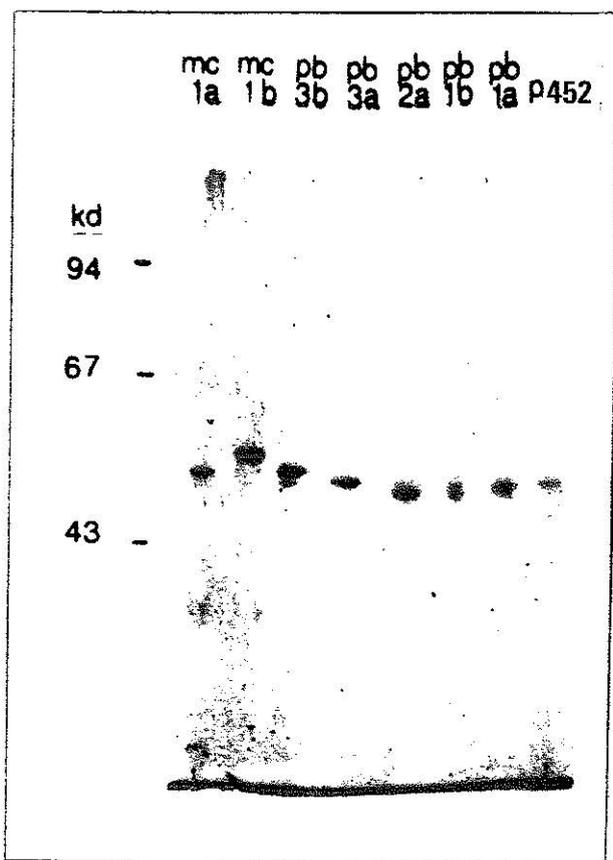
Le même profil électrophorétique est observé avec les microsomes hépatiques de rats non traités, qu'ils soient mâles ou femelles, ou traités par l'acide tiénilique (AT). La bande majoritaire présente correspond au cytochrome P-450-UT-A (IIC11) (environ 53 kd). Un traitement des rats par le phénobarbital (PB), inducteur classiquement utilisé, augmente fortement la quantité d'au moins deux protéines majoritaires par rapport à des microsomes de rats non traités, les cytochromes P-450-PB-B (IIB1) et PB-D (IIB2) ainsi que la proportion d'époxyde hydrolase. Deux protéines semblent également être induites par traitement des rats par le clofibrate (CLO) ou par le fénofibrate (FEN). Le double traitement clofibrate puis acide tiénilique (CLO-AT) conduit au même profil électrophorétique que le traitement par le clofibrate seul (CLO). Un ensemble de cytochromes P-450, proche du cytochrome P-450-UT-A, est considérablement augmenté en cas de traitement par la cyano-16 $\alpha$ -pregnenolone (PCN) ou par le triacétate d'oléandomycine (TAO). Le traitement des rats par la  $\beta$ -naphthoflavone (BNF) induit deux bandes protéiques supplémentaires comparativement à celles obtenues à partir de microsomes de rats non traités.

### III.1.1.3. Cytochromes P-450 purifiés de foie de rat

Différentes isoenzymes des cytochromes P-450 hépatiques de rat, dont la présence dans les microsomes vient d'être décrite figure 14, ont été purifiées dans le laboratoire de R. WOLF (Edimbourg, Ecosse) (69). Après purification, à partir de microsomes hépatiques de rat, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de ces protéines montre la présence d'une seule bande homogène.

La figure 15 illustre cela pour les cytochromes P-450 mc1a (ISF-G, IA2), mc1b (BNF-B, IA1), pb2a (UT-A, IIC11) et p-452 (IVA1). Les isoenzymes pb3b (PB-D, IIB2) et pb1b (PB-C, IIC6) sont, quant à eux, respectivement contaminés par les formes pb3a (PB-B, IIB1) et pb1a qui leur sont très proches par leurs caractéristiques biochimiques.

Fig.15 : Migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide de cytochromes P-450 purifiés de foie de rat.



Electrophorèse sur gel SDS/polyacrylamide (9 %) de 0,25 µg de chaque cytochrome P-450 purifié de foie de rat (nomenclature de Wolf). Coloration par le bleu de Coomassie.

III.1.2. RECONNAISSANCE DES CONSTITUANTS MICROSOMAux DE FOIE HUMAIN ET DE RAT PAR LES ANTICORPS ANTI-LKM2 ET PAR CERTAINS ANTICORPS ANTI-CYTOCHROMES P-450 DE RAT.

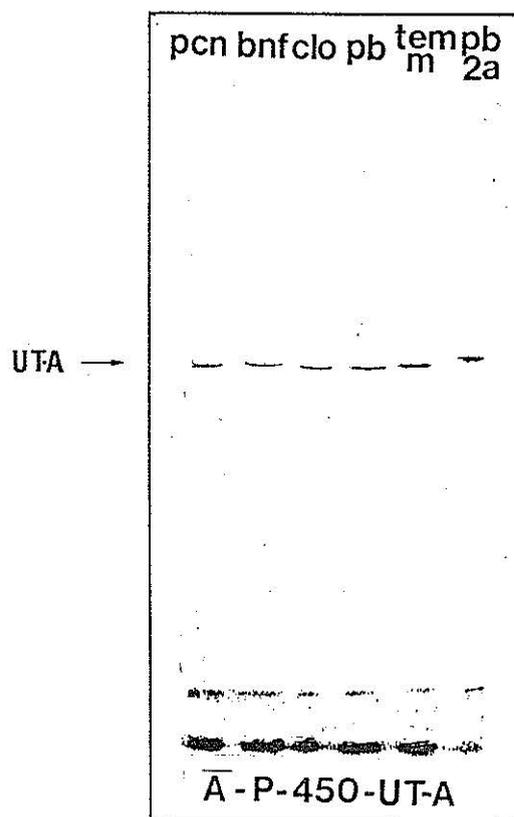
Après avoir montré le profil protéique des microsomes de foie humain et de rat après électrophorèse sur gel de polyacrylamide, nous pouvons maintenant nous intéresser à leur reconnaissance par les sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 (TAY, JOR, CAI) qui nous ont été donnés par le Pr HOMBERG (Hôpital Saint Antoine, Paris).

A titre de comparaison, un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le cytochrome P-450-UT-A (IIC11) de rat et provenant du laboratoire de R. WOLF (Edimbourg, Ecosse) a également été utilisé, après avoir vérifié que cet anticorps était bien spécifique. La figure 16 montre que ce sérum reconnaît une seule protéine au niveau des microsomes hépatiques de rats non traités (tem m) ou traités par différents inducteurs (pb, clo, bnf, pcn). Cette protéine correspondrait au cytochrome P-450-UT-A (IIC11) présent de façon constitutive chez tous les rats. La spécificité de cet anticorps a été également montrée par la reconnaissance des cytochromes P-450 de rat purifiés décrits précédemment (Figure 17). Cet anticorps ne révèle que le cytochrome P-450 pb2a (UT-A, IIC11). Il est donc spécifique d'une forme majoritaire de cytochromes P-450 présente chez le rat mâle non traité, le cytochrome P-450-UT-A (IIC11).

III.1.2.1. Microsomes de foie humain

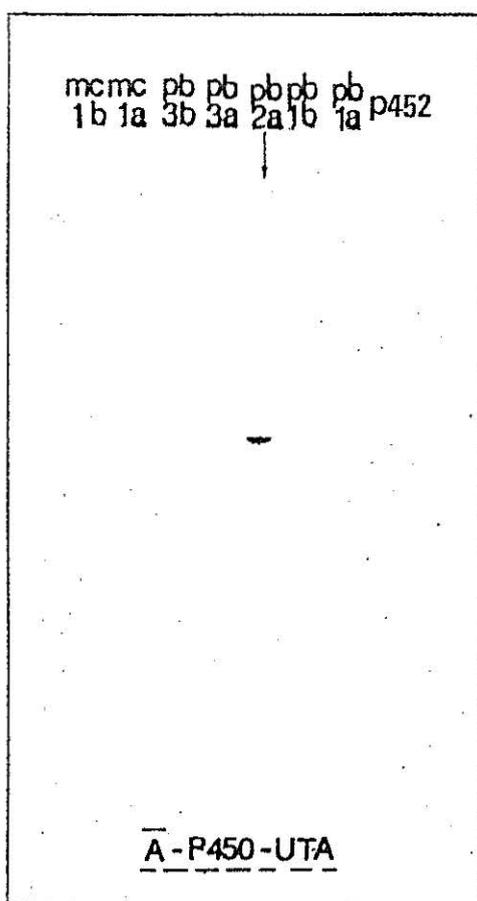
Avant d'aborder la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 des microsomes hépatiques de rat, il était intéressant de montrer le profil de reconnaissance par ces anticorps et par l'anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A de rat, des microsomes de foie humain.

Fig. 16 : Reconnaissance par immuno-transfert de microsomes hépatiques de rat par un anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A de rat.



Electrophorèse sur gel SDS/polyacrylamide (9 %) de 20  $\mu$ g de chaque fraction microsomale hépatique de rats mâles non traités (tem m) ou traités respectivement par PB, CLO, BNF et PCN (pb, clo, bnf, pcn) et de 0,25  $\mu$ g de cytochrome P-450 purifié (pb2a) de foie de rat, transfert sur nitrocellulose et immunorévélation par un sérum de lapin contenant des anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A (pb2a, IIC11) de rat.

Fig. 17 : Reconnaissance par immuno-transfert de cytochromes P-450 purifiés de foie de rat par un anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A de rat.



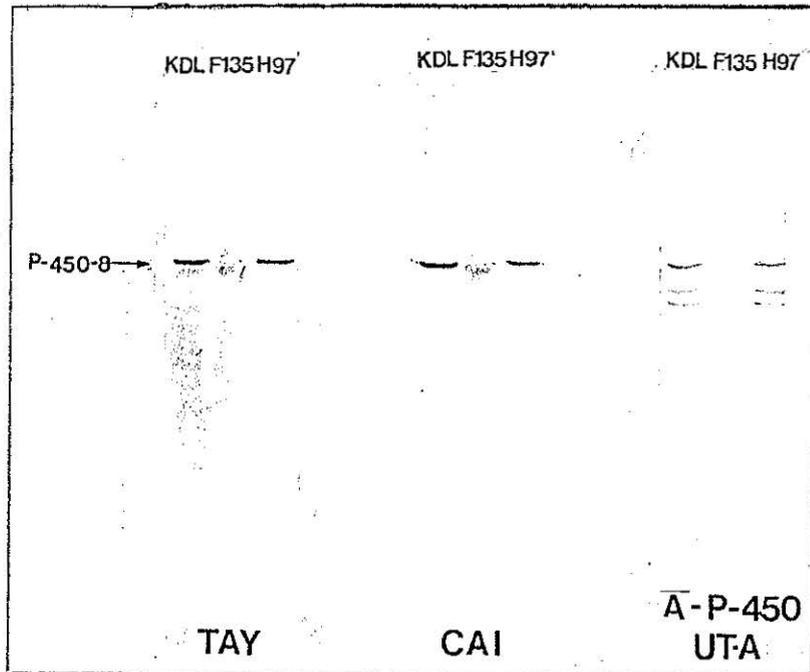
Electrophorèse sur gel SDS/polyacrylamide (9 %) de 0,25 µg de chaque cytochrome P-450 purifié de foie de rat (nomenclature de Wolf), transfert sur nitrocellulose et immunorévélation par un sérum de lapin contenant des anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A (pb2a, IIC11) de rat.

Les microsomes hépatiques utilisés sont ceux d'un sujet normal (H97), d'un sujet hydroxylateur lent pour la méphénytoïne (KDL) et d'un foetus (F135). La figure 18 montre que les deux sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 (TAY et CAI) se comportent de façon identique. Ils révèlent par immunotransfert une seule protéine microsomale de foie humain. Cette protéine est présente à la fois dans les microsomes H97 et KDL. Aucune différence ne peut être mise en évidence au niveau de la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 des protéines hépatiques d'un sujet normal (H97) et d'un sujet hydroxylateur lent pour la méphénytoïne (KDL). La protéine microsomale de foie humain reconnue par les sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 (TAY, CAI) correspond au cytochrome P-450-8 (55). Cette protéine est absente dans le foie foetal, ce qui explique que les anticorps anti-LKM2 ne révèlent aucune protéine dans les microsomes F135. Ces résultats sont analogues à ceux déjà publiés (55).

La révélation des protéines microsomales de foie humain par le sérum de lapin contenant des anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A (IIC11) de rat montre que cet anticorps reconnaît également le cytochrome P-450-8 humain ainsi que deux protéines supplémentaires de poids moléculaire plus faible. Comme les anticorps anti-LKM2, l'anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A ne reconnaît aucune protéine dans les microsomes de foie foetal. Le profil de reconnaissance des protéines microsomales de foie humain par les anticorps anti-LKM2 est relativement simple puisque ces sérums ne révèlent qu'une seule protéine avec laquelle réagissent de façon croisée des anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A (IIC11) de rat.

Nous allons maintenant étudier la reconnaissance par ces anticorps anti-LKM2 des microsomes hépatiques de rat.

Fig. 18 : Reconnaissance par immuno-transfert de microsomes de foie humain par des anticorps anti-LKM2 ou anti-cytochrome P-450-UT-A de rat.



Electrophorèse sur gel de SDS/polyacrylamide (9 %) de 20 µg de chaque fraction microsomale de foie humain d'un sujet normal (H97), d'un sujet hydroxylateur lent pour la méphénytoïne (KDL) et d'un foetus (F135), transfert sur nitrocellulose et immunorévélation par des sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 (TAY, CAI) ou un sérum de lapin contenant des anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A(IIC11) de rat, dilués au 1/100<sup>è</sup>.

### III.1.2.2. Microsomes hépatiques de rat

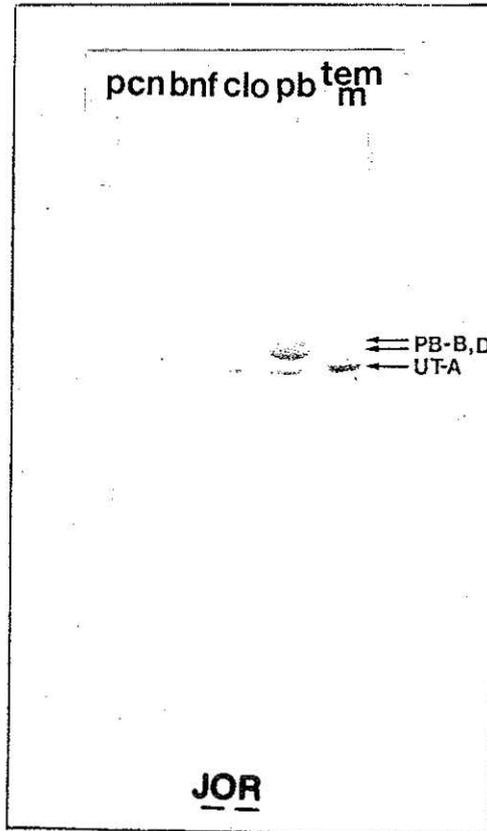
Divers microsomes hépatiques de rats témoins ou traités par des produits connus pour induire différentes classes de cytochromes P-450 (PB, CLO, BNF, PCN), ont été étudiés vis-à-vis de leur reconnaissance par différents sérums.

La figure 19 montre que le sérum humain JOR contenant des anticorps anti-LKM2 révèle une protéine dans les microsomes de rats témoins (tem m) ou traités par le clofibrate (clo), 3 protéines dans les microsomes de rats traités par le phénobarbital (pb) et aucune protéine dans les microsomes de rats traités par la  $\beta$ -naphtoflavone (bnf) ou la cyano-16 $\alpha$ -pregnenolone (pcn).

La protéine révélée à la fois dans les microsomes tem, pb et clo correspond, d'après son poids moléculaire, au cytochrome P-450-UT-A (IIC11). Cette isoenzyme bien que présente dans tous les microsomes hépatiques de rat (puisque'il s'agit d'une forme constitutive) n'est pas révélée par les anticorps anti-LKM2 dans les microsomes bnf ou pcn. Cela peut s'expliquer par une répression importante du cytochrome P-450-UT-A (IIC11) après traitement des rats par ces deux inducteurs (24). Le tableau 8 illustre ce phénomène. En effet, le taux de cytochrome P-450-UT-A est de 1,2 nmole P-450/mg protéines dans des microsomes hépatiques de rats témoins mais ce taux tombe à 0,49 en cas d'induction par le phénobarbital et n'est seulement que de 0,33 dans les microsomes de rats traités par la  $\beta$ -naphtoflavone ou la cyano-16 $\alpha$ -pregnenolone. Le taux de cytochrome P-450-UT-A dans ces microsomes doit être inférieur au seuil de détection par les anticorps anti-LKM2.

Les anticorps anti-LKM2 révèlent également deux protéines supplémentaires dans les microsomes de rats traités par le phénobarbital. Ces protéines pourraient correspondre aux formes majeures induites par le phénobarbital, les cytochromes P-450-PB-B (IIB1) et PB-D(IIB2). Ces formes sont spécifiquement présentes dans les

Fig. 19 : Reconnaissance par immuno-transfert de microsomes hépatiques de rat par un anticorps anti-LKM2.



Electrophorèse sur gel SDS/polyacrylamide (9 %) de 20 µg de chaque fraction microsomale hépatique de rats mâles non traités (tem m) ou traités respectivement par PB, CLO, BNF, PCN (pb, clo, bnf, pcn), transfert sur nitrocellulose et immunorévélation par un sérum humain contenant des anticorps anti-LKM2 (JOR), dilué au 1/100<sup>è</sup>.

Tableau 8 : Quantification immunologique des diverses apoprotéines des cytochromes P-450 dans des microsomes hépatiques de rats mâles Sprague-Dawley traités par différents inducteurs (d'après 24).

Protéines	Traitement des rats			
	Témoin	PB	BNF	PCN
P-450-UT-A (nmole/mg protéines)	1,2	0,49	0,33	0,33
P-450-PB-B	0,03	1,27	0,04	0,10
P-450-BNF-B	0,04	0,04	1,41	0,06
P-450-PB-C	0,36	0,69	0,26	0,31
P-450-PB-D	0,07	0,92	0,04	0,09
P-450-PB/PCN-E	0,39	1,06	0,33	1,32
P-450-UT-F	0,15	0,10	0,12	0,08
P-450-BNF/ISF-G	< 0,03	< 0,03	0,57	< 0,03
Concentration totale en apo-protéine (nmole/mg protéines)	2,24	4,57	3,10	2,29
Concentration totale en cytochrome P-450 (apo-protéine ayant inséré l'hème) (nmole/mg protéines)	1,1	2,39	1,69	1,86

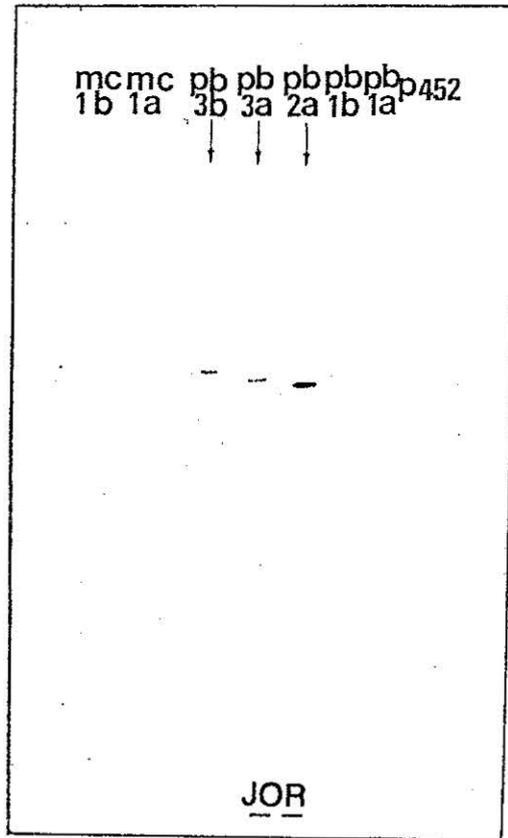
microsomes de rats traités par le phénobarbital. Leurs taux respectifs, d'après le tableau 8, sont alors de 1,27 et 0,92 nmole/mg protéines. Ce taux devient pratiquement nul dans les autres types de microsomes de rat.

Le sérum humain JOR contenant des anticorps anti-LKM2 réagit donc de façon croisée avec des protéines microsomales hépatiques de rat présentes chez des rats témoins ou traités par le phénobarbital ou le clofibrate.

#### III.1.2.3. Cytochromes P-450 purifiés de foie de rat

Dans le but de confirmer la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 de protéines microsomales hépatiques de rat, nous avons révélé à l'aide de ces sérums les différents cytochromes P-450 purifiés de foie de rat dont nous disposions. La figure 20 montre la reconnaissance par le sérum JOR de trois de ces cytochromes P-450 purifiés ; les formes pb2a (UT-A, IIC11), pb3a (PB-B, IIB1) et pb3b (PB-D, IIB2). Ces protéines correspondent respectivement à une forme majeure de cytochrome P-450 présente chez les rats non traités et à deux formes induites par le phénobarbital. La forme pb2a est reconnue par ce sérum de façon plus intense que les formes pb3a et pb3b. Par contre, les formes mc1a (BNF-B, IA1), mc1b (ISF-G, IA2), pb1a, pb1b (PB-C, IIC6) et p-452 (IVA1) ne sont pas du tout révélées par les anticorps anti-LKM2. Ces résultats, obtenus à partir de cytochromes P-450 purifiés de foie de rat, sont tout à fait en accord avec ceux observés précédemment à partir des fractions microsomales hépatiques de rat.

Fig. 20 : Reconnaissance par immuno-transfert de cytochromes P-450 purifiés de foie de rat par un anticorps anti-LKM2.



Electrophorèse sur gel SDS/polyacrylamide (9 %) de 0,25 µg de chaque cytochrome P-450 purifié de foie de rat (nomenclature de Wolf), transfert sur nitrocellulose et immunorévélation par un sérum humain contenant des anticorps anti-LKM2 (JOR) dilué au 1/100<sup>è</sup>.

### III.1.3. CONCLUSION

Les résultats obtenus sur la reconnaissance par immunotransfert de protéines microsomales hépatiques par des sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 ou un sérum de lapin contenant des anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A de rat sont résumés dans le tableau 9. Les résultats que nous venons de montrer avec le sérum humain JOR peuvent être généralisés à deux autres sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 (TAY et CAI). En effet, une reconnaissance des mêmes protéines microsomales hépatiques a été obtenue avec ces deux autres sérums.

Les anticorps anti-LKM2 réagissent de façon croisée avec trois protéines microsomales hépatiques de rat. La protéine reconnue majoritairement est le cytochrome P-450 pb2a (UT-A, IIC11) présent dans les microsomes de rats témoins ou traités par le clofibrate ou le phénobarbital. Le taux de ce cytochrome étant fortement diminué par traitement des rats par la  $\beta$ -naphthoflavone, ou la cyano-16  $\alpha$ -pregnenolone, il n'est pas révélé par les anticorps-anti-LKM2 dans ces microsomes. Deux autres isoenzymes, inductibles par le phénobarbital, pb3a (PB-B, IIB1) et pb3b (PB-D, IIB2) sont également reconnues par les anticorps anti-LKM2, mais de façon minoritaire.

Les anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A de rat réagissent, quant à eux, de façon croisée avec des protéines microsomales de foie humain dont le cytochrome P-450-8 contre lequel sont dirigés les anticorps anti-LKM2.

La reconnaissance des protéines microsomales hépatiques de rat par les sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2, est en bon accord avec des résultats préliminaires effectués par P. BEAUNE (Hôpital Necker, Paris) (70). En utilisant

Tableau 9 : Reconnaissance par immuno-transfert de protéines microsomales hépatiques par des anticorps anti-LKM2 ou un anti-cytochrome P-450-UT-A de rat.

Sérums	Protéines																
	Cytochromes P-450 de rat purifiés								Microsomes								
	pb			mc					Rat					Humain			
	1a	1b	2a	3a	3b	1a	1b	P-452	tem	pb	clo	bnf	pcn	H97	H86	KDL	F135
<u>Ā-LKM2</u>																	
JOR	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
TAY	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
CAI	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<u>Ā-Cyt-</u>																	
<u>P-450</u>																	
UT-A	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

également le sérum JOR, il révèle par les techniques d'immuno-transfert une protéine dans les microsomes hépatiques de rats témoins et au moins deux protéines dans les microsomes de rats induits par le phénobarbital. De même, les cytochromes P-450 UT-A (IIC11) et PB-B (IIB1) purifiés dans son laboratoire, sont reconnus par le sérum JOR. Une autre étude sur la reconnaissance croisée entre protéines microsomales hépatiques de rat et sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 a été publiée très récemment par WAXMAN et coll. (71). Dans cette étude, les sérums humains (contenant des anticorps anti-LKM2) utilisés ne révèlent aucune protéine hépatique, qu'elle soit humaine ou de rat, par la technique d'immuno-transfert. Toutes leurs études ont donc été réalisées en "dot-blot", technique où les protéines sont directement déposées sur nitrocellulose, sans dénaturation préalable par le SDS, la révélation se faisant ensuite de façon identique à la technique d'immuno-transfert. La différence majeure entre ces deux techniques réside donc

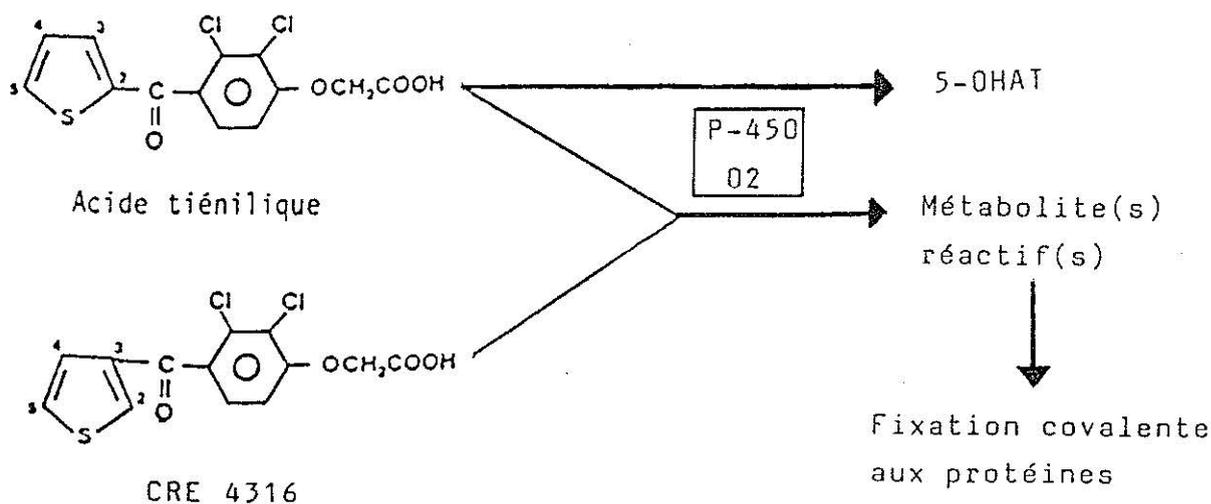
dans la dénaturation ou non des protéines. Par cette technique de "dot blot", ces auteurs montrent que les anticorps anti-LKM2 reconnaissent certains cytochromes P-450 purifiés de foie de rat. Les isoenzymes reconnues par ces sérums correspondent aux formes UT-F (IIA1), PB-C (IIC6) et UT-A (IIC11), les formes BNF-B (IA1), ISF-G (IA2), PB-B (IIB1) et PB-D (IIB2) n'étant pas du tout révélées.

Ces résultats sont en accord avec les nôtres en ce qui concerne la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 de la forme UT-A (IIC11) et la non reconnaissance des formes BNF-B (IA1) et ISF-G (IA2). Ne disposant pas du cytochrome P-450 UT-F (IIA1), nous ne sommes pas en mesure de comparer ce résultat. La différence observée dans la reconnaissance par ces sérums des formes PB-C (IIC6), PB-B (IIB1) et PB-D (IIB2) peut provenir de la technique utilisée (système natif ou dénaturé) et des sérums eux-mêmes. En effet, WAXMAN et coll. indiquent que les sérums qu'ils ont testés présentent une variabilité dans la reconnaissance des protéines microsomales hépatiques de rat (71).

### III.2. INHIBITION DE LA TRANSFORMATION DE L'ACIDE TIÉNILIQUE OU DE SON ISOMÈRE (CRE 4316) EN MÉTABOLITES RÉACTIFS PAR LES ANTICORPS ANTI-LKM2

Des études précédentes avaient montré qu'au cours de l'oxydation de l'acide tiénilique ou de son isomère (CRE 4316), il se formait, entre autres, des métabolites réactifs capables de se fixer de façon covalente sur les protéines hépatiques (Figure 21)(52). Le taux de fixation covalente observé à partir du CRE 4316 était environ 10 fois supérieur à celui de l'acide tiénilique (52) d'où son intérêt dans cette étude.

Fig. 21 : Activation métabolique de l'acide tiénilique ou du CRE 4316.



L'activation métabolique implique la formation de métabolites stables mais aussi la transformation en métabolites réactifs dont on peut mesurer une partie par la fixation covalente sur les protéines hépatiques. Les anticorps anti-LKM2 peuvent-ils inhiber cette formation de métabolites réactifs à partir de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 donc interagir avec les cytochromes P-450 responsables de l'activation métabolique ou seulement avec d'autres cytochromes P-450 ?

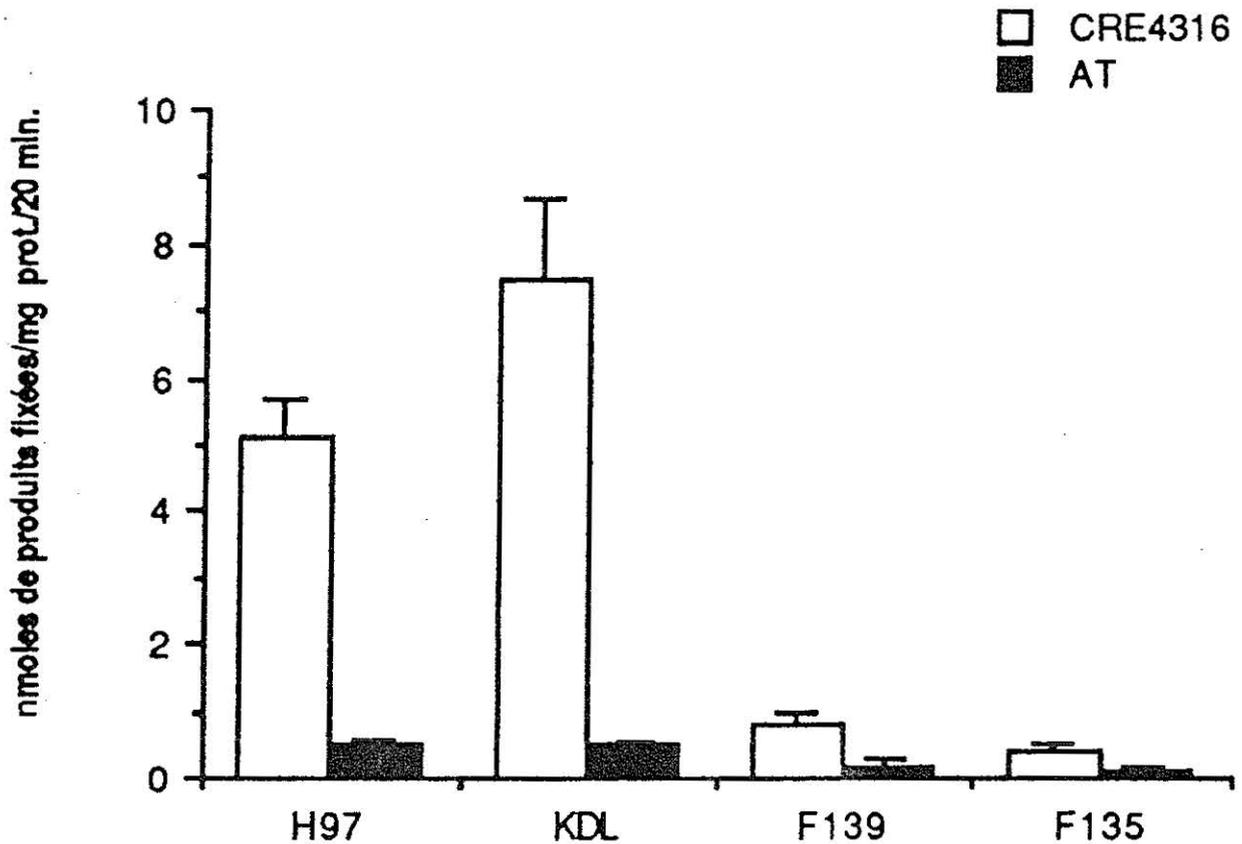
Nous allons tout d'abord nous intéresser à l'activation métabolique de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 par des microsomes de foie humain avant de réaliser la même étude à l'aide de microsomes hépatiques de rat.

III.2.1. FIXATION COVALENTE DE METABOLITES REACTIFS DE L'ACIDE TIENILIQUE OU DU CRE4316 SUR DES PROTEINES MICROSOMALES DE FOIE HUMAIN

Après incubation de différentes préparations microsomales en présence d'acide tiénilique (marqué au  $^{14}\text{C}$  sur la fonction cétone) ou de son isomère (CRE 4316), de cofacteurs nécessaires à l'activation métabolique (système générant du NADPH) et d'oxygène moléculaire, on note l'apparition en fonction du temps d'une fixation irréversible de métabolites issus de ces composés sur les protéines microsomales hépatiques.

Des résultats précédents obtenus au laboratoire (53) avaient permis de sélectionner les conditions expérimentales. Nous avons donc mesuré ici les taux de fixation covalente dans les conditions standards dérivées de cette étude, à savoir une incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 20 minutes en présence de 0,2 nmole de P-450 pour 150  $\mu\text{l}$  d'incubat. Les résultats donnant les taux de fixation covalente, de l'acide tiénilique ou de son isomère, comparés pour quatre types de microsomes humains sont indiqués figure 22. Quel que soit le type de microsomes humains, adultes (H97, KDL) ou foetaux (F135, F139), le taux de fixation covalente de métabolites réactifs dérivés du CRE 4316 est toujours de 4 à 10 fois supérieur à celui de l'acide tiénilique. Cette différence entre les deux composés est en accord avec les résultats d'études précédentes effectuées au laboratoire (52). Si l'on compare maintenant les taux de fixation covalente obtenus avec les microsomes H97 et KDL, aucune différence significative n'apparaît entre les microsomes hépatiques d'un sujet normal ou d'un sujet hydroxylateur lent pour la méphénytoïne. De même, les taux de fixation covalente obtenus avec deux préparations microsomales de foie foetal (F135 et F139) sont équivalents. Par contre, on note une différence importante entre les taux de fixation covalente de dérivés de l'acide tiénilique ou du

Fig. 22 : Taux de fixation covalente de métabolites de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur les protéines microsomales de différents foies humains.



Taux de fixation covalente obtenus après incubation pendant 20 min à 37°C de 0,2 nmole de cyt. P-450, d'un système générateur de NADPH et de 0,1 mM de substrat radioactif (AT ou CRE 4316) dans un volume final de 150 µl. Les résultats indiqués sont la valeur moyenne  $\pm$  ES obtenue sur 14 déterminations (7 expériences indépendantes) pour les microsomes H97 et sur 4 déterminations (2 expériences indépendantes) pour les autres microsomes.

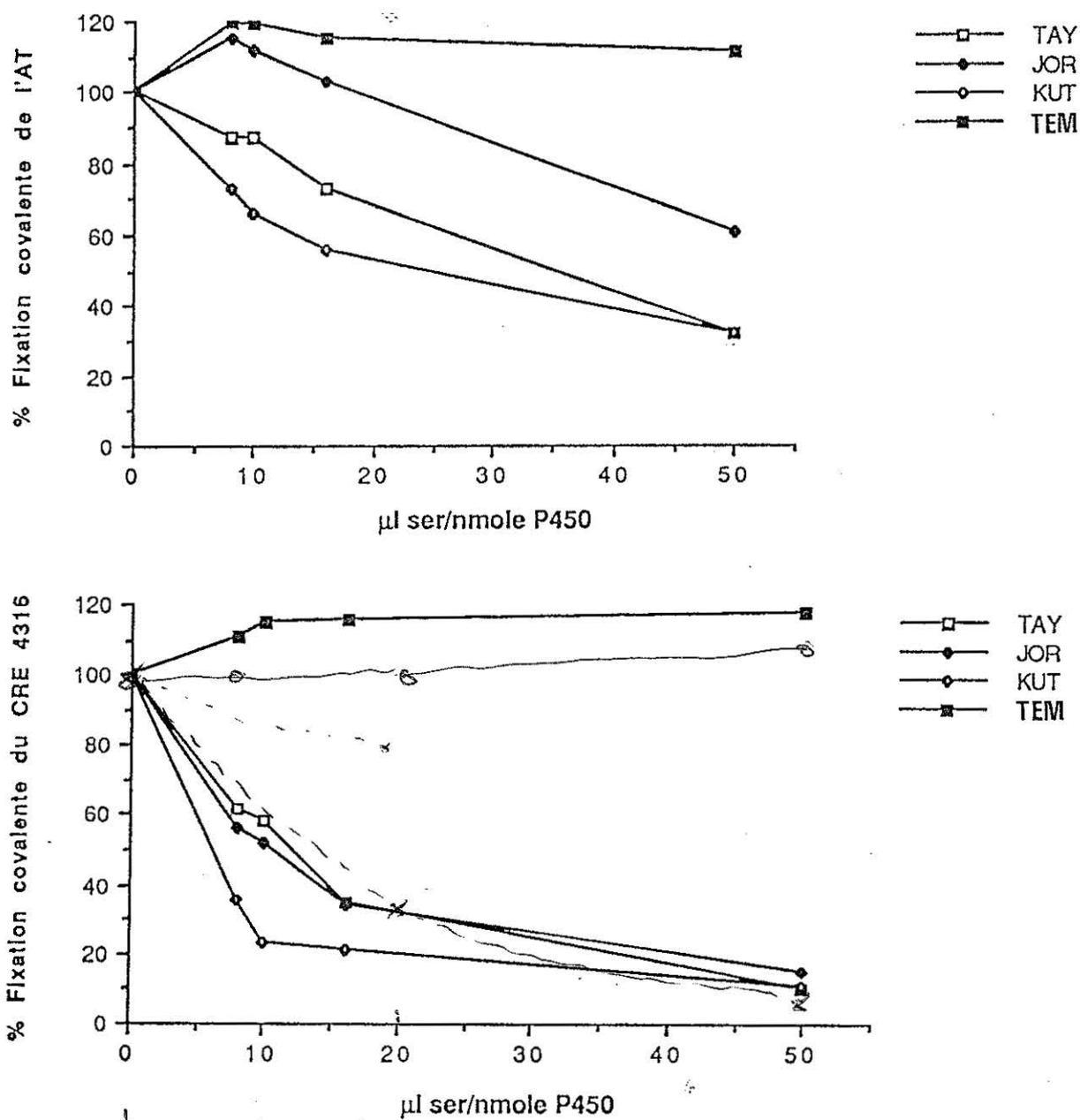
CRE 4316 sur les protéines microsomales de foie adulte et sur les protéines microsomales de foie foetal. Le taux faible obtenu dans le cas de microsomes de foie foetal peut être expliqué par l'absence de cytochrome P-450-8. Ces résultats suggèrent que cette isoenzyme est non seulement responsable de l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique mais également de la transformation en métabolites réactifs de ce composé ou de son isomère. Cependant, le taux de fixation covalente de ces produits sur les protéines microsomales de foie foetal n'est pas nul. Le faible taux observé pourrait correspondre à la formation de métabolites réactifs par des cytochromes P-450 différents du cytochrome P-450-8.

La fixation covalente due à l'acide tiénilique étant faible, les études d'inhibition de la transformation en métabolites réactifs par les anticorps anti-LKM2 n'ont été réalisées qu'à partir du CRE 4316 afin qu'elles puissent être interprétables et significatives. Une seule étude sera présentée avec l'acide tiénilique à titre de comparaison.

### III.2.2. INHIBITION DE LA TRANSFORMATION DE L'ISOMERE DE L'ACIDE TIENILIQUE (CRE 4316) EN METABOLITES REACTIFS PAR LES ANTICORPS ANTI-LKM2

Ces études d'inhibition de la transformation du CRE 4316 en métabolites réactifs par des sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 ont été réalisées en préincubant les microsomes en présence de différentes quantités de sérum (exprimées en  $\mu$ l de sérum/nmole de P-450) pendant 20 min à 4°C avant l'addition des cofacteurs et du produit radioactif. La figure 23 présente les résultats obtenus pour l'inhibition de la fixation covalente de métabolites dérivés de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur des protéines microsomales de foie humain de sujet adulte normal (H97) par 3 sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 (TAY, JOR, KUT).

Fig. 23 : Inhibition de la fixation covalente de métabolites de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur des protéines microsomales de foie humain H97 en présence de sérums contenant des anticorps anti-LKM2.

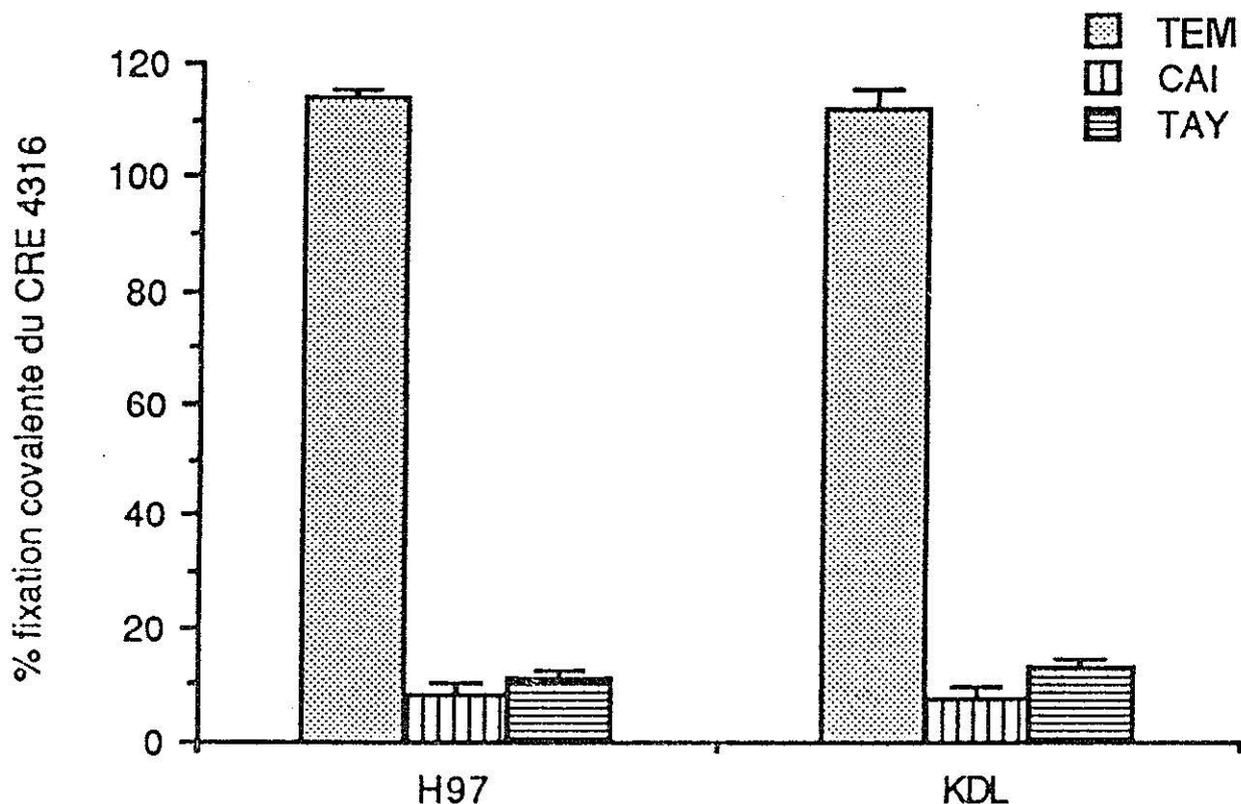


Pourcentage de fixation covalente de métabolites de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur les microsomes de foie humain H97 obtenu en présence de sérums humains témoins ou contenant des anticorps anti-LKM2 (TAY, JOR, KUT) par rapport à une expérience témoin sans sérum (100 % correspond à 0,45 nmole d'AT fixées/mg protéines/20 min ou à 4,9 nmoles de CRE 4316 fixées/mg protéines/20 min).

La première remarque est que le sérum humain témoin (ne contenant pas d'anticorps anti-LKM2) ne conduit à aucune inhibition de cette fixation covalente, voire même à une légère activation (très souvent observée avec les sérums humains). Les trois sérums (contenant des anticorps anti-LKM2) utilisés se comportent de la même façon dans l'inhibition de la fixation covalente de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur les protéines microsomales de foie humain H97, les courbes d'inhibition obtenues étant parallèles, voire confondues. L'addition d'une quantité croissante de sérums contenant des anticorps anti-LKM2 conduit à une inhibition progressive allant jusqu'à 70 % dans le cas de l'acide tiénilique et totale dans le cas du CRE 4316. On a toujours constaté qu'au delà de 50 µl de sérum/nmole de P-450, il n'y avait pas de modification notable de l'inhibition. C'est pourquoi, dans les autres expériences, du fait des faibles quantités de sérums que nous possédions, les mesures ont été réalisées avec 50 µl de sérum/nmole de P-450.

Ainsi, les résultats suivants seront présentés comme la figure 24 montrant l'inhibition de la transformation en métabolites réactifs du CRE 4316 par deux sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 (CAI, TAY). L'addition de ces sérums provoque une inhibition pratiquement totale (de l'ordre de 90 %) de la fixation covalente de métabolites réactifs du CRE 4316 sur les protéines microsomales de foie humain d'un sujet normal (H97) ou d'un sujet hydroxylateur lent pour la méphénytoïne (KDL). Là encore, ces deux types de microsomes humains ne montrent pas de différence entre eux. Il est à noter que le sérum humain témoin (ne contenant pas d'anticorps anti-LKM2) ne conduit à aucune inhibition. Ces résultats suggèrent que l'activation en métabolites réactifs de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 est sous la dépendance du cytochrome P-450-8. En effet, les anticorps anti-LKM2 inhibent de façon presque totale la fixation covalente de ces métabolites sur les protéines microsomales de foie humain.

Fig. 24 : Inhibition de la fixation covalente de métabolites du CRE 4316 sur des protéines microsomales de différents foies humains en présence de sérums contenant des anticorps anti-LKM2.



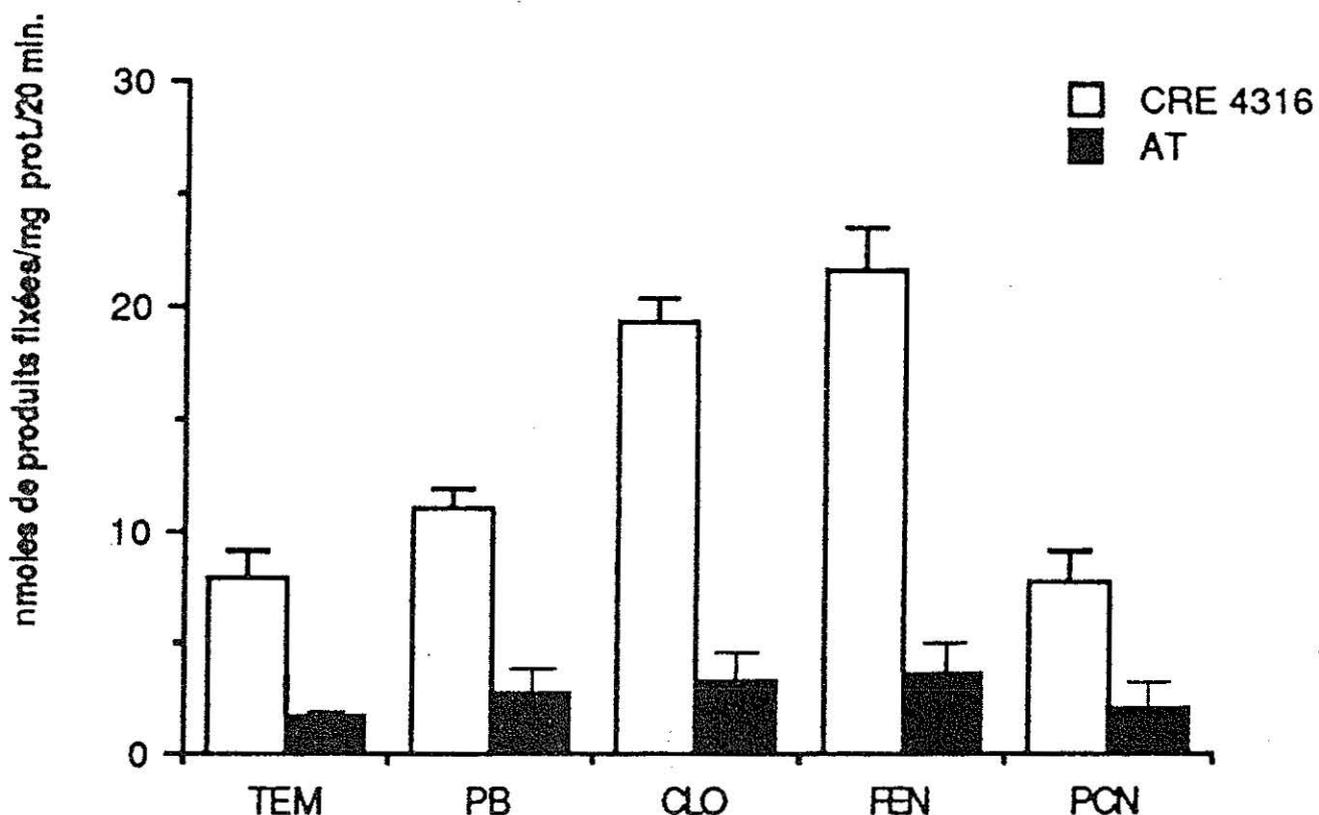
Pourcentage de fixation covalente de métabolites du CRE 4316 sur les microsomes de foie humain H97 ou KDL en présence de sérums humains (50  $\mu$ l de sérum/nmole P-450), témoins ou contenant des anticorps anti-LKM2 (CAI, TAY) par rapport à une expérience témoin sans sérum (100 % correspond à 5,1 nmoles de CRE 4316 fixées/mg protéines/20 min pour les microsomes H97 et à 7,5 pour les microsomes KDL. Le pourcentage indiqué ici représente la valeur moyenne  $\pm$  ES sur 3 expériences.

### III.2.3. FIXATION COVALENTE DE METABOLITES REACTIFS DE L'ACIDE TIENILIQUE OU DU CRE 4316 SUR DES PROTEINES MICROSOMALES HEPATIQUES DE RAT.

La figure 25 montre les taux de fixation covalente de métabolites réactifs de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 obtenus après activation *in vitro* par les cytochromes P-450 présents dans les différentes fractions microsomales hépatiques de rat en présence des cofacteurs nécessaires. Comme dans le cas des microsomes de foie humain, il est noté que le taux de fixation covalente du CRE 4316 est supérieur (de 4 à 6 fois) à celui de l'acide tiénilique quels que soient les microsomes hépatiques de rat considérés. La comparaison des différents types de microsomes hépatiques de rat montre que le taux de fixation covalente de métabolites réactifs dérivés de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 est analogue sur les protéines microsomales hépatiques de rats témoins ou traités par la cyano-16 $\alpha$ -pregnenolone (respectivement de  $7,9 \pm 1,2$  et  $7,7 \pm 1,4$  nmoles CRE fixées/mg protéines/20 min et de  $1,7 \pm 0,1$  et  $2,1 \pm 0,8$  nmoles AT fixées/mg protéines/20 min). Un traitement des rats par le phénobarbital provoque une augmentation d'environ 40 % de la fixation covalente de métabolites réactifs de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur ces microsomes par rapport à des microsomes de rats non traités. Un phénomène remarquable concerne le traitement des rats par le clofibrate ou le fénofibrate, aux capacités inductrices proches (72).

Un traitement des rats par l'un de ces produits conduit à multiplier par un facteur 2,5 environ le taux de fixation covalente de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur les protéines microsomales hépatiques de ces rats. Ce résultat est en bon accord avec les résultats obtenus au laboratoire par E. NEAU (73) qui a montré qu'un traitement des rats par le clofibrate augmentait de façon beaucoup plus importante l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique que les autres inducteurs hépatiques classiques.

Fig. 25 : Taux de fixation covalente de métabolites de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur des protéines microsoma-  
les hépatiques de rats différemment traités.



Taux de fixation covalente obtenu après incubation pendant 20 min à 37°C de 0,2 nmole de cyt. P-450, d'un système géné-  
rateur de NADPH et de 0,1 mM de substrat radioactif (AT ou CRE 4316) dans un volume final de 150 µl: Les résultats indiqués  
sont la valeur moyenne  $\pm$  ES obtenue sur n = 4 expériences pour les microsomes TEM, n = 3 pour les microsomes PB et CLO et  
n = 2 pour les microsomes FEN et PCN.

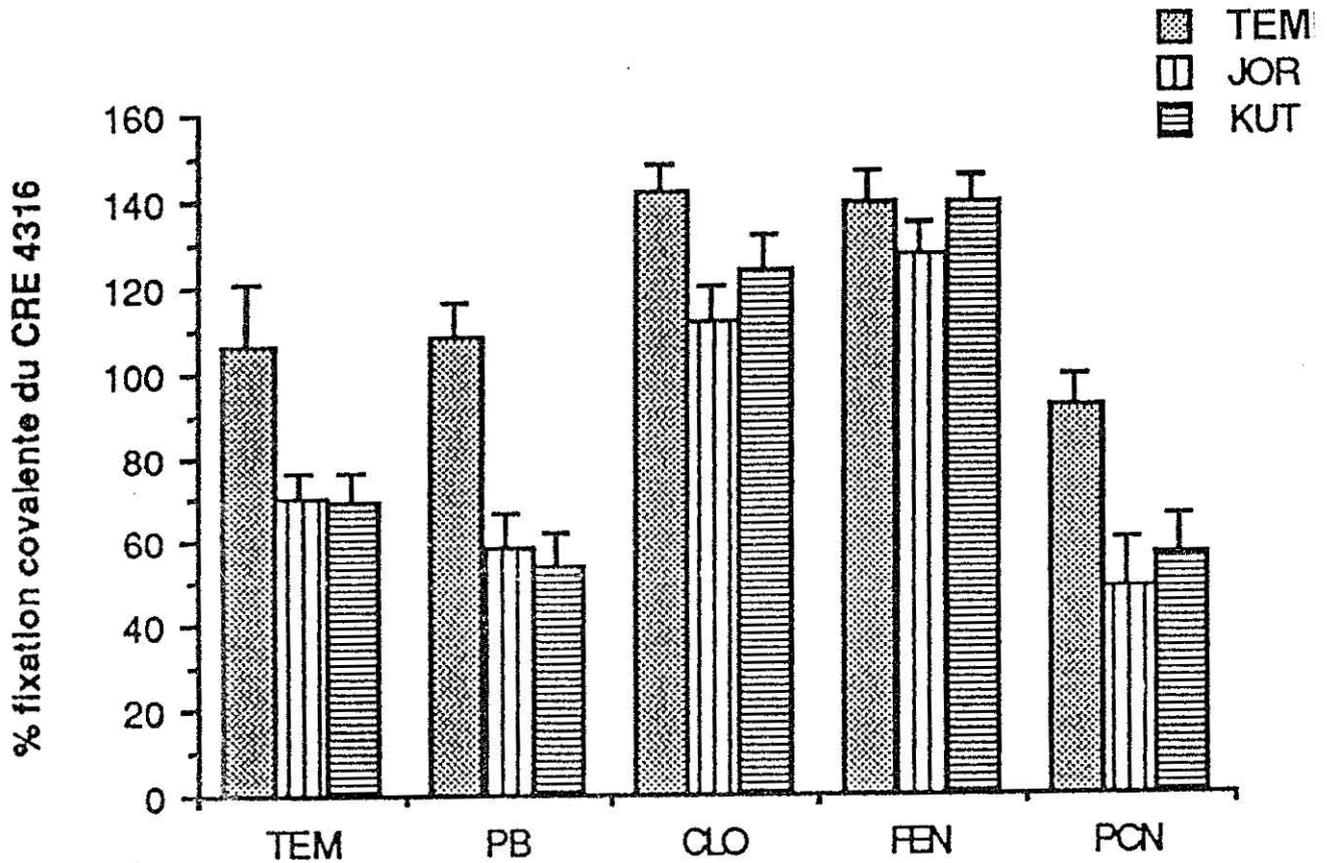
#### III.2.4. INHIBITION DE LA TRANSFORMATION DE L'ISOMERE DE L'ACIDE TIENILIQUE (CRE 4316) EN METABOLITES REACTIFS PAR LES ANTICORPS ANTI-LKM2

Deux sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 (JOR, KUT) ont été étudiés en ce qui concerne leur capacité à inhiber la transformation en métabolites réactifs du CRE 4316, par des microsomes hépatiques de rats différemment induits. La figure 26 montre que les deux sérums (KUT et JOR) ont un comportement identique. Ils inhibent de façon nette (30 à 40 %) la formation de métabolites réactifs du CRE 4316 par les microsomes de rats témoins (TEM) ou traités par le phénobarbital (PB) ou la cyano-16 $\alpha$ -pregnenolone (PCN). Le sérum humain témoin (ne contenant pas d'anticorps anti-LKM2) ne provoque aucune inhibition, voire même une légère activation. Par contre, les anticorps anti-LKM2 sont incapables d'inhiber la formation de métabolites du CRE 4316 par les microsomes de rats traités par un hypolipidémiant (CLO ou FEN).

#### III.2.5. CONCLUSIONS

Afin d'expliquer la capacité des sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 à inhiber (ou non) la transformation métabolique de l'acide tiénilique ou de son isomère par différents microsomes hépatiques de rat, il est nécessaire de revenir à des résultats obtenus par E. NEAU au laboratoire (74). Ces résultats montrent que la 5-hydroxylation de l'acide tiénilique est majoritairement dépendante du cytochrome P-450-UT-A (IIC11) dans les microsomes de rats témoins ou traités par la cyano-16 $\alpha$ -pregnenolone (PCN). Cette isoenzyme et des formes spécifiquement induites par le phénobarbital sont responsables de la formation de 5-OHAT par les microsomes de rats PB. Par contre, l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique par des microsomes de rats traités par le clofibrate est due seulement de façon minoritaire au cytochrome P-450-UT-A (IIC11) et essentiellement à une (ou des) isoenzyme(s) induite(s) par le clofibrate mais non encore bien définie(s) (75).

Fig. 26 : Inhibition de la fixation covalente de métabolites du CRE 4316 sur des protéines microsomaes hépatiques de rats en présence de sérums contenant des anticorps anti-LKM2.



Pourcentage de fixation covalente de métabolites du CRE 4316 sur des microsomes hépatiques de rats témoins ou induits par PB, CLO, FEN ou PCN en présence de sérums humains (50  $\mu$ l de sérum/nmole P 450) témoins ou contenant des anticorps anti-LKM2 (JOR, KUT) par rapport à une expérience témoin sans sérum (100 % correspond à 7,9 nmoles de CRE 4316 fixées/mg protéines/20 min pour les microsomes TEM, à 11,1 pour les microsomes PB, à 19,3 pour les microsomes CLO, à 21,5 pour les microsomes FEN et à 7,7 pour les microsomes PCN). Le pourcentage indiqué ici représente la valeur moyenne  $\pm$ ES sur 4 déterminations (2 expériences indépendantes).

La capacité des anticorps anti-LKM2 à inhiber la formation de métabolites réactifs du CRE 4316 par les microsomes de rats témoins (TEM), PB ou PCN est en bon accord à la fois avec les résultats obtenus par E. NEAU et avec ce que nous avons montré précédemment par la technique d'immuno-transfert. En effet, le cytochrome P-450-UT-A (IIC11) et certaines formes induites par le phénobarbital (IIB1 et IIB2) sont reconnues en immuno-transfert par les anticorps anti-LKM2. Ces isoenzymes sont également responsables de la formation du métabolite stable de l'acide tiénilique (5-OHAT). Il n'est donc pas surprenant que ces cytochromes P-450 soient aussi à l'origine de la formation de métabolites réactifs à partir de l'acide tiénilique ou de son isomère.

Ce qui, à priori, semble plus curieux, c'est l'incapacité des anticorps anti-LKM2 d'inhiber la formation de métabolites réactifs du CRE 4316 par les microsomes de rats CLO ou FEN. En effet, le cytochrome P-450-UT-A (IIC11) est présent dans les microsomes de rats CLO et est même reconnu au sein de ces microsomes par les anticorps anti-LKM2 en immuno-transfert. On peut expliquer cette apparente contradiction par le fait que l'hydroxylation de l'acide tiénilique par les microsomes de rats induits par le clofibrate est très majoritairement sous la dépendance d'une isoenzyme autre que le cytochrome P-450-UT-A (IIC11). Si ce résultat est extrapolé à l'activation métabolique dans son ensemble (avec formation de métabolites réactifs), on comprend que les anticorps anti-LKM2 qui, apparemment, ne reconnaissent que le cytochrome P-450-UT-A (IIC11) et des formes induites par le phénobarbital, ne provoquent aucune inhibition nette avec les microsomes CLO. L'absence de reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 d'un cytochrome P-450, spécifiquement induit par le clofibrate et assurant l'activation métabolique de l'acide tiénilique chez le rat, pourrait expliquer l'absence d'inhibition observée.

### III.3. RÉACTIVITÉ DES ANTICORPS ANTI-LKM2 SUR COUPES DE FOIE DE RATS DIFFÉREMMENT TRAITÉS

Après avoir déterminé au niveau moléculaire, par les techniques décrites précédemment (cf. III.1. et III.2), les protéines hépatiques de rat reconnues par les anticorps anti-LKM2, il était intéressant de revenir sur le test, en immunofluorescence indirecte, utilisé pour la détection de ces anticorps anti-tissus sur coupes d'organes de rat.

Avant d'aborder cette étude, il était nécessaire de rappeler brièvement l'anatomo-histologie du foie et du rein pour la meilleure compréhension de cette technique.

#### III.3.1. RAPPELS

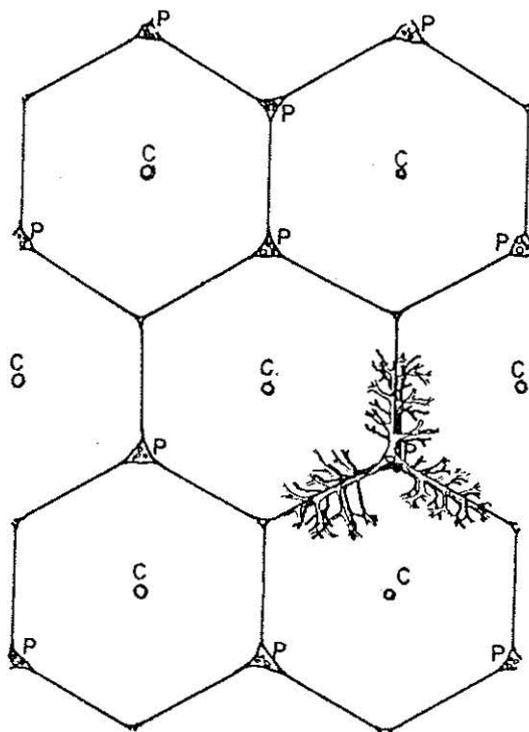
##### III.3.1.1. Anatomo-histologie du foie de rat

Le foie de rat est constitué de plusieurs lobes eux-mêmes divisés en lobules de structure hexagonale comme il est indiqué figure 27. Au centre de chaque lobule, se trouve la veine centrolobulaire (C) et en périphérie les espaces portes (P). Chaque espace porte comprend une artériole, une veinule, un canalicule biliaire et un lymphatique. La circulation sanguine se fait de la périphérie vers le centre du lobule. Les hépatocytes sont organisés en travées à partir de la veine centrolobulaire, les sinus veineux passant entre chaque travée. On différencie généralement les hépatocytes centrolobulaires (proches de la veine centrolobulaire), des hépatocytes périportaux (situés près des espaces portes).

##### III.3.1.2. Anatomo-histologie du rein de rat

Le rein de rat est également constitué de lobules organisés en pyramides et comprenant chacun une unité fonctionnelle, le néphron. La figure 28 représente un néphron, canalicule rénal comprenant différentes parties. L'artère inter-lobulaire (AIL)

Fig. 27 : Structure schématique du foie de rat



Structure hexagonale des lobules hépatiques avec, au centre, la veine centrolobulaire (C) et, en périphérie, les espaces portes (P).

arrive au glomérule (G) qui se poursuit par le tube proximal, divisé lui-même en tube contourné proximal (TCP) et anse de Henlé (H). Cette anse de Henlé se continue par le tube distal (TD) qui revient au contact du glomérule et se jette ensuite dans le tube collecteur (TC).

Fig. 28 : Structure d'un lobule rénal

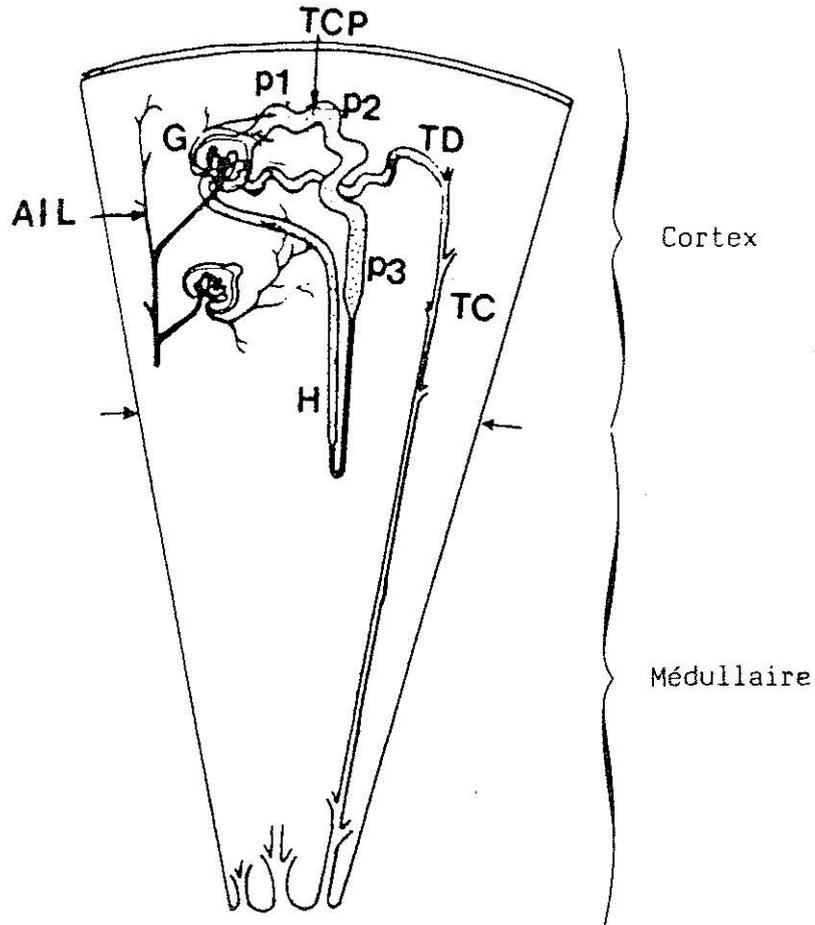


Schéma d'un néphron avec l'artère inter-lobulaire (AIL), le glomérule (G), le tube contourné proximal (TCP), l'anse de Henlé (H), le tube distal (TD) et le tube collecteur (TC) ; p<sub>1</sub>, p<sub>2</sub> et p<sub>3</sub> étant les différentes parties du tube proximal.

Les parties importantes du néphron pour la détection des anticorps anti-tissus par immunofluorescence indirecte sur coupes de rein de rat sont les trois segments ( $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_3$ ) du tube proximal décrits figure 29.

Fig. 29 : Structure du rein de rat (d'après STERNBERG).

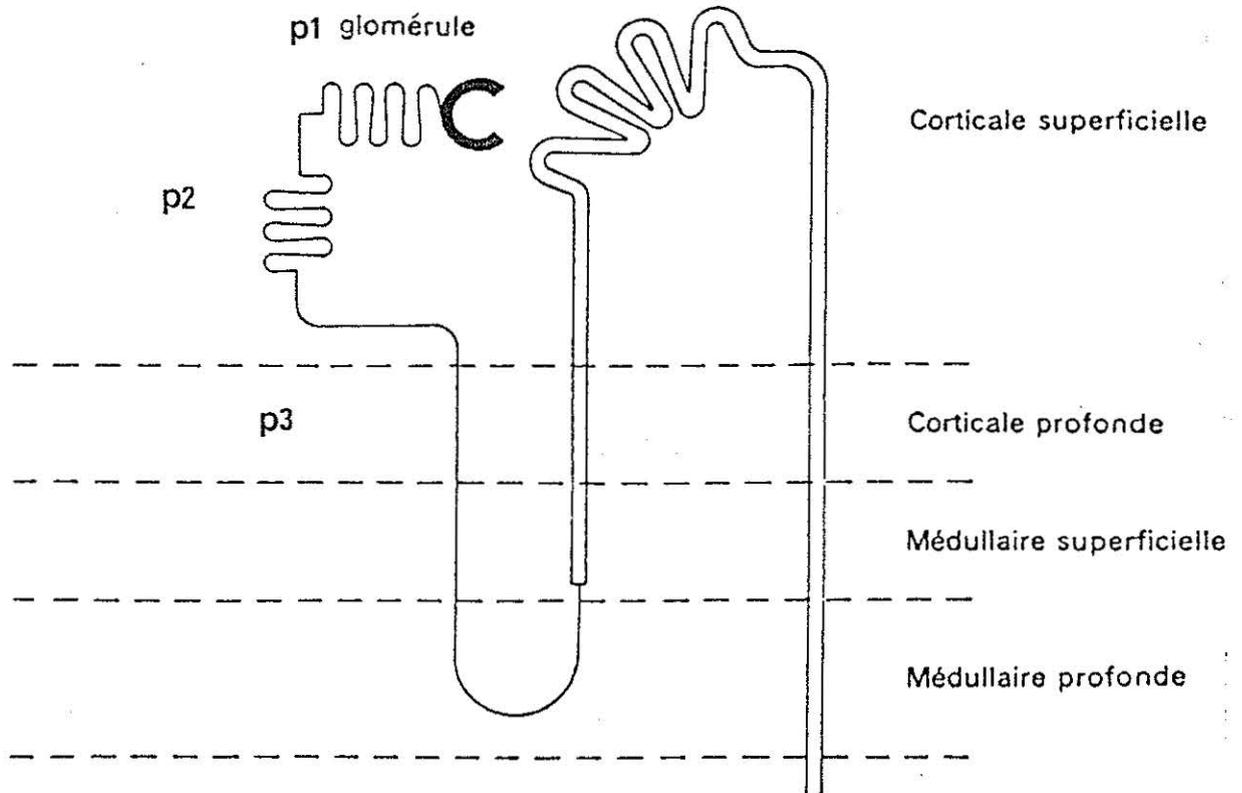


Schéma d'un néphron avec les trois parties du tube proximal  
 $p_1$  : tube contourné proximal ;  $p_2$  : pars recta et  $p_3$  : anse de Henlé.

III.3.1.3. Détection des anticorps anti-LKM par immunofluorescence indirecte sur coupes d'organes

Selon l'intensité de fluorescence obtenue au niveau des différents organes (foie, rein, principalement) de rat et éventuellement de souris, il est identifié le type d'auto-anticorps présents dans le sérum de malades. A chaque auto-anticorps correspond un profil particulier en immunofluorescence indirecte. Celui des anticorps anti-LKM (1 et 2) est résumé dans le tableau 10.

Tableau 10 : Profil de reconnaissance en immunofluorescence indirecte d'organes de rat et de souris par les anticorps anti-LKM

Organes			Anti-LKM2	Anti-LKM1
Rat mâle	Foie	Hépatocytes centrolobulaires	+++	+++
		périportaux	+++	+++
	Rein	P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub>	+++	+
		P <sub>3</sub>	+ (*)	+++
Souris mâle	Foie	Hépatocytes centrolobulaires	+++	+++
		périportaux	+	+++
	Rein	P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub>	+++	+
		P <sub>3</sub>	+	+++

(\*) hétérogène

Les anticorps anti-LKM présentent en immunofluorescence indirecte sur coupes d'organes une fluorescence granulaire répartie régulièrement dans le cytoplasme des cellules. Une fluorescence intense (+++) est observée aussi bien avec les anticorps

anti-LKM1 que les anti-LKM2 au niveau de tous les hépatocytes de rat. Par contre, sur coupes de foie de souris mâle, les anticorps anti-LKM1 présentent une fluorescence homogène alors que les anticorps anti-LKM2 réagissent plus faiblement (+) au niveau des hépatocytes périportaux. La distinction des anticorps anti-LKM1 et anti-LKM2 se fait également au niveau du rein de rat ou de souris. Les anticorps anti-LKM2 conduisent à l'apparition d'une fluorescence intense de  $p_1$  et  $p_2$  (+++) mais faible au niveau de  $p_3$  (+), l'inverse étant observé dans le cas des anticorps anti-LKM1. De plus, au niveau du rein de rat, les anticorps anti-LKM2 montrent une fluorescence hétérogène des cellules de  $p_3$  (1 cellule sur 10 est plus fortement fluorescente). La figure 30 illustre les caractéristiques essentielles des anticorps anti-LKM2 en immunofluorescence indirecte sur coupes d'organes à savoir une fluorescence homogène sur foie de rat, hétérogène sur foie de souris mâle et sur les cellules de  $p_3$  de rein de rat.

### III.3.2. REACTIVITE DES ANTICORPS ANTI-LKM2 SUR COUPES DE FOIE DE RATS DIFFEREMMENT TRAITES

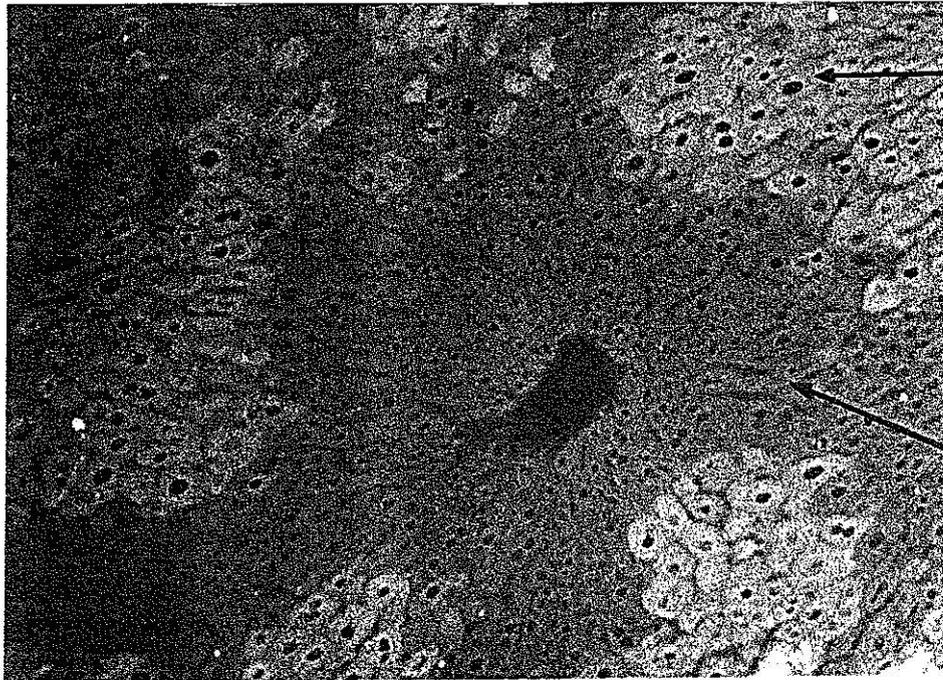
#### III.3.2.1. Immunofluorescence indirecte

Les anticorps anti-LKM2 réagissent en immunofluorescence indirecte sur les coupes de foie de rats non traités. Le but de cette étude est de voir si un traitement des rats par des inducteurs des cytochromes P-450 hépatiques (PB, CLO, BNF, TAO), par l'acide tiénilique, seul (AT), ou après prétraitement par le clofibrate (CLO-AT), ou par l'isomère de l'acide tiénilique (CRE 4316), modifie de façon importante l'intensité de fluorescence des anticorps anti-LKM2 sur coupes de foie de ces rats par rapport à des coupes de foie de rats non traités.

Afin de comparer la reconnaissance par les sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2, des coupes de foie de rats

Fig. 30 : Immunofluorescence indirecte des anticorps anti-LKM2 sur coupes de foie et de rein

Foie de rat (x 100)

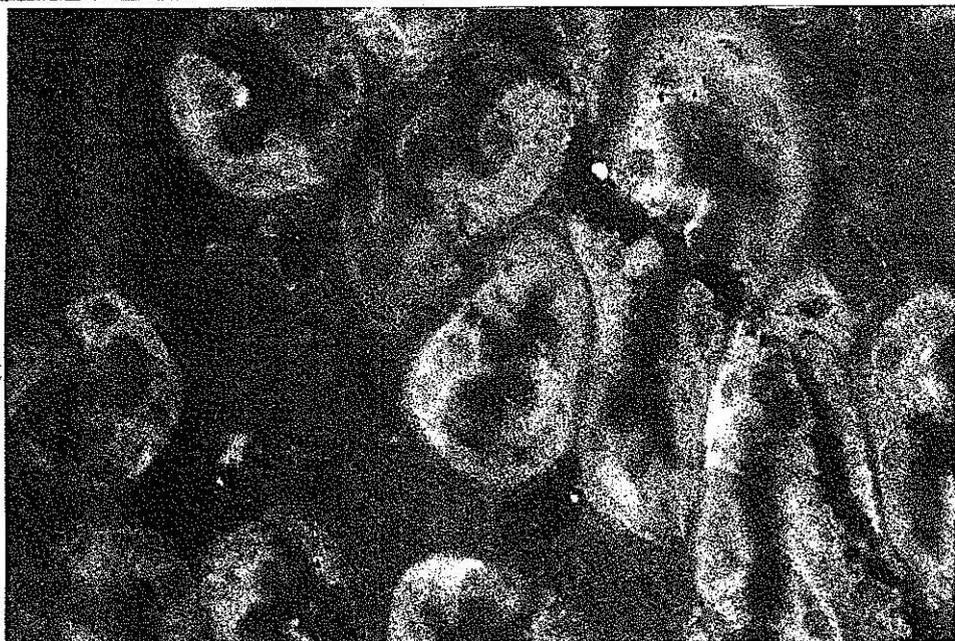


hépatocytes  
centrolobulaires

Foie de souris mâle (x 100)

hépatocytes  
périportaux

P3 de rein de rat  
(x 400)



Coupes d'organes révélées par un sérum humain (KUT) contenant des anticorps anti-LKM2 et dilué au 1/200

tel-00653612, version 1 - 19 Dec 2011

différemment traités, une titration des sérums est réalisée nous permettant de choisir 4 dilutions adéquates. Cette titration consiste à déterminer la dilution du sérum à partir de laquelle aucune reconnaissance par immunofluorescence n'est observée. Le tableau 11 montre cette titration, pour le sérum JOR. Une forte fluorescence est notée aux dilutions 1/20<sup>e</sup> et 1/40<sup>e</sup>. L'intensité de fluorescence reste importante aux dilutions 1/80<sup>e</sup> à 1/320<sup>e</sup>, diminue au 1/640<sup>e</sup>, atteint le seuil de détection aux 1/1280<sup>e</sup> et 1/2560<sup>e</sup> et n'est plus détectable aux dilutions supérieures.

Tableau 11 : Titration en immunofluorescence indirecte d'un sérum contenant des anticorps anti-LKM2 sur coupes d'organes de rat non traité.

Sérum JOR	Foie	Rein p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>
1/20 <sup>e</sup>	+++	+++	
1/40 <sup>e</sup>	+++	+++	→
1/80 <sup>e</sup>	+++	+++	
1/160 <sup>e</sup>	++	++	
1/320 <sup>e</sup>	++	++	
1/640 <sup>e</sup>	+	+	→
1/1280 <sup>e</sup>	(+)	(+)	→
1/2560 <sup>e</sup>	-	-	→
1/5120 <sup>e</sup>	-	-	
1/10240 <sup>e</sup>	-	-	

L'intensité de fluorescence observée lors de la révélation par les anticorps anti-LKM2 de coupes d'organes est notée comme suit, dans le sens décroissant : +++>+++>++>++>+>(+)>->->-  
 → indique les dilutions choisies.

A partir de ce tableau, on a choisi 4 dilutions dont une donnant une intensité de fluorescence importante (+++)(1/40<sup>e</sup>) et

trois autres pour lesquelles on passe d'une reconnaissance positive à une absence de reconnaissance. Ce seuil de détection étant situé au 1/1280<sup>e</sup>. Cette dilution et les deux dilutions qui l'encadrent (1/640<sup>e</sup> et 1/2560<sup>e</sup>) ont donc été utilisées. Deux autres sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 (KUT, TAY) ont été, parallèlement au sérum JOR, testés aux dilutions 1/40<sup>e</sup>, 1/640<sup>e</sup>, 1/1280<sup>e</sup> et 1/2560<sup>e</sup> sur les coupes de foie de rats différemment traités (TEM, PB, CLO, BNF, TAO, CRE 4316, AT, CLO-AT) ainsi que sur coupes de foie de rat foetal. Le tableau 12 résume l'ensemble des observations.

Les résultats obtenus sur coupes de foie de rats non traités (TEM) permettent de classer les 3 sérums contenant des anticorps anti-LKM2. KUT est le sérum le plus actif avec une perte de reconnaissance à une dilution supérieure au 1/2560<sup>e</sup>, puis viennent JOR qui ne reconnaît déjà plus rien à cette dilution et TAY dont la dernière dilution positive est le 1/640<sup>e</sup>.

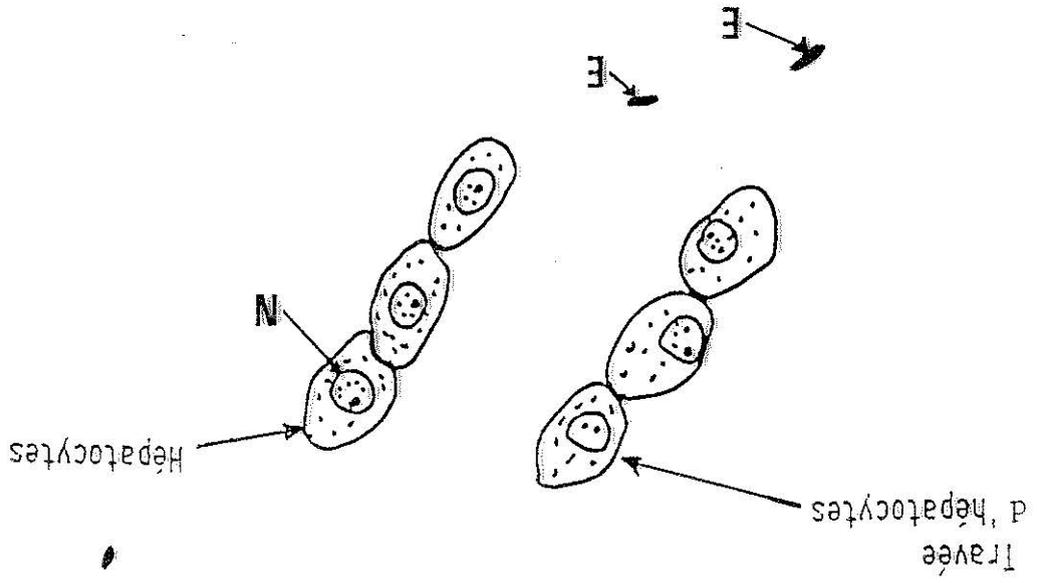
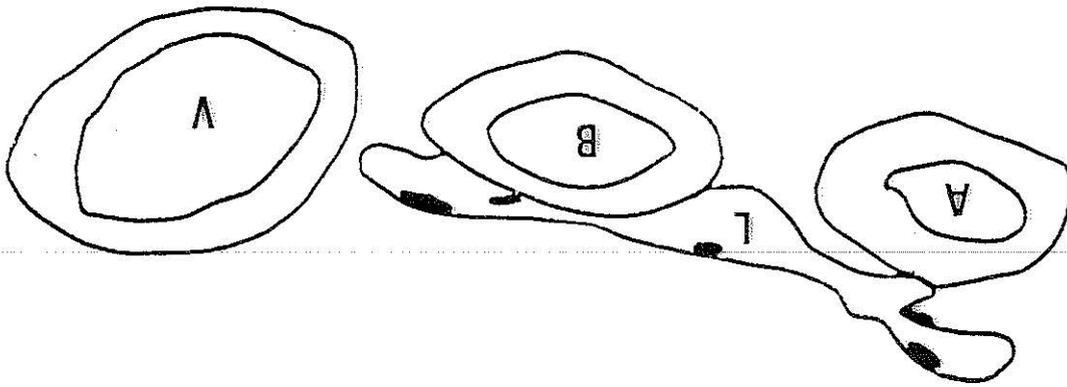
S'il est comparé maintenant la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 des coupes de foie de rats traités par rapport à celles de rats témoins, il apparaît que certains traitements ne changent pas le seuil de reconnaissance et que d'autres le modifient légèrement, soit dans le sens d'une augmentation, soit dans le sens d'une diminution. Le sérum JOR reconnaît de façon équivalente les coupes de foie de rats TEM et CLO. Ce sérum reconnaît moins bien celles de rats traités par BNF, TAO ou CRE 4316. A la dilution 1/1280<sup>e</sup>, l'intensité de fluorescence est négative (-) alors qu'elle est encore légèrement positive chez les témoins (+). La reconnaissance est un peu améliorée par traitement des rats par AT ou CLO-AT et peut-être par PB (il subsiste une certaine fluorescence (+) au 1/2560<sup>e</sup>).

En considérant le sérum KUT, la révélation, en immunofluorescence indirecte est identique pour les coupes de foie de

Tableau 12 : Effet de l'induction des rats sur la reconnaissance (en immunofluorescence indirecte) de coupes de foie de rats par des anticorps anti-LKM2.

Dilution Sérum \ Rat	TEM	PB	CLO	BNF	TAO	CRE 4316	AT	CLO-AT	Foetus
1/40	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
1/640	+	+	+	(+)	+	++	++	++	-
1/1280	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+	+	-
1/2560	-	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	-
=====									
1/40	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
1/640	++	++	++	+	+	+	++	++	-
1/1280	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+	++	-
1/2560	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	+	-
=====									
1/40	++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	-
1/640	(+)	(+)	+	-	+	-	+	+	-
1/1280	-	-	(+)	-	-	-	(+)	(+)	-
1/2560	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Intensité de fluorescence obtenue à partir de 3 sérums humains (JOR, KUT, TAY) contenant des anticorps anti-LKM2 sur coupes de foie de rats traités : +++ > +++ > ++ > ++ > + > (+) > - > -  
 3 expériences ont été réalisées sur 3 lots de rats différents.



I

rats TEM, PB, CLO, CRE 4316 et AT, mais diminuée pour celles de rats traités par BNF ou TAO. La fluorescence s'éteint au 1/2560è alors qu'elle subsiste encore au niveau des coupes de foie de rats témoins. Une augmentation de l'intensité est notée en cas de traitement par CLO-AT. La fluorescence est encore nette au 1/2560è (+).

Le troisième sérum testé (TAY) révèle les coupes de foie de rats TEM et PB avec la même intensité. Une intensité plus faible est observée au niveau des foies de rats traités par BNF, TAO et CRE 4316 où la fluorescence est franchement négative au 1/1280è. Une fluorescence est encore détectable au 1/1280è (+) en cas de traitement des rats par CLO, AT ou CLO-AT.

Ces observations sont résumées de façon globale (tous sérums confondus) dans le tableau 13. La reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 de coupes de foie de rats traités par PB ou CLO est identique à celle de coupes de foies de rats non traités (TEM). L'intensité des reconnaissances est diminuée en cas de traitement des rats par BNF, TAO et CRE 4316 et augmentée si les rats sont traités par AT ou CLO-AT.

Tableau 13 : Comparaison en immunofluorescence indirecte de la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 de coupes de foie de rats différemment traités.

Intensités de fluorescence / Coupes de rats témoins	Traitement des rats
Intensité analogue	- Phénobarbital (PB) - Clofibrate (CLO)
Intensité inférieure	- $\beta$ -Naphthoflavone (BNF) - Triacétate d'oléandomycine (TAO) - CRE 4316
Intensité supérieure	- Acide tiénilique (AT) - Clofibrate puis acide tiénilique (CLO-AT)

Ce tableau compare la reconnaissance par trois sérums contenant des anticorps anti-LKM2 (JOR, KUT, TAY) de coupes de foies de rats différemment traités : résultats basés sur les intensités relatives de fluorescence décrites dans le tableau 11.

De cette étude, se dégage une donnée importante : quel que soit le traitement administré aux rats, il existe toujours une reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 des coupes de foie de rats. Cette reconnaissance peut être, dans certains cas, légèrement diminuée ou améliorée mais elle subsiste. Ce résultat est en bon accord avec ceux précédemment obtenus (cf. III.1 et III.2), à savoir une réactivité croisée entre les sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 et une forme constitutive de cytochrome P-450 présente chez tous les rats, quel que soit le traitement. Il est constaté une reconnaissance plus faible quand cette isoenzyme est réprimée par certains inducteurs (BNF, TAO).

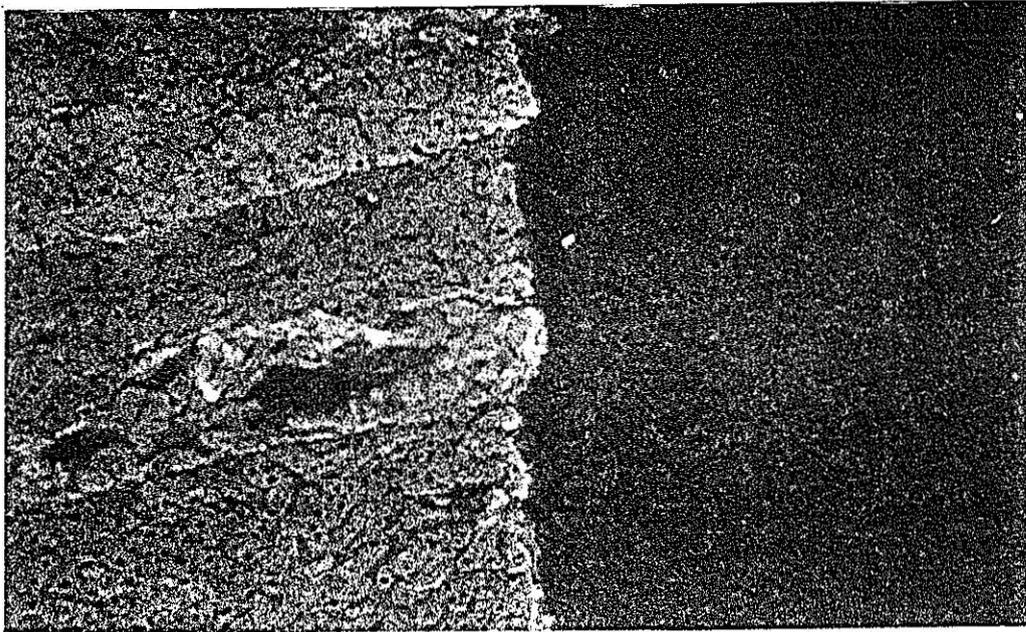
Un autre résultat vient conforter ces conclusions. En effet, les anticorps anti-LKM2 ne révèlent rien sur coupes de foie de rat foetal (Tableau 12 p.100). Ceci est cohérent avec le fait que le cytochrome P-450-UT-A (IIC11) est absent dans le foie foetal (23). La figure 31 montre la fluorescence obtenue par un sérum contenant des anticorps anti-LKM2 sur coupes de foie de rat femelle et de foie de rat foetal. (Un foie de rat femelle a été utilisé ici car lors du prélèvement du foie de foetus, il était plus facile de prélever le foie de la mère et de congeler ensemble ces deux organes afin de pouvoir ensuite comparer en immunofluorescence indirecte un même sérum sur ces deux foies).

La reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 de foie de rat femelle pourrait sembler surprenante du fait de l'absence du cytochrome P-450-UT-A (IIC11) chez les femelles (23). Cela peut être expliqué par la présence chez les rats femelles d'un autre cytochrome P-450, le cytochrome P-450-UT-I (IIC12) qui présente avec le cytochrome P-450-UT-A une très forte homologie (71 %) (75). Une réactivité croisée entre les anticorps anti-LKM2 et le cytochrome P-450-UT-I de rat est donc tout à fait compréhensible et n'est pas contradictoire avec ce que nous

Fig.31 : Fluorescence indirecte de coupes de foie de rat femelle et de foie de rat foetal en présence d'anticorps anti-LKM2.

Foie de rat femelle

Foie de rat foetal



Coupe de foie de rat femelle et de foie de rat foetal révélée par un sérum humain (KUT) contenant des anticorps anti-LKM2 et dilué au 1/20è.

venons de montrer tout au long de ce chapitre. Le test de détection de ces auto-anticorps peut se faire invariablement sur coupes de foie de rats mâles ou femelles (41).

#### III.3.2.2. Observations histologiques des foies de rats traités

Parallèlement à l'étude en immunofluorescence indirecte, des interactions entre anticorps anti-LKM2 et coupes de foie de rats traités, il était intéressant de faire une étude histologique de ces foies afin de détecter d'éventuels désordres engendrés par ces traitements.

Les observations histologiques ont été réalisées par le Dr. N. MAURIN (Hôpital Saint Antoine, Paris). Tous les foies et reins de rats traités ont été observés mais on décrira plus

particulièrement l'histologie du foie de rats traités par le clofibrate, l'acide tiéniliqne ou l'association des deux par comparaison avec celle d'un foie de rat non traité. Dans le foie de rat témoin (figure 32), l'espace porte comprend la veine (V), l'artère (A), le canal biliaire (B) et le lymphatique (L). Ce dernier est vide car il n'y a pas d'inflammation. Les hépatocytes organisés en travées sont de taille régulière. Le noyau (N) est central, comprend un nucléole et la chromatine est différenciée en granules bien visibles. Des grains sont répartis régulièrement dans le cytoplasme. Les sinus veineux passant entre chaque travée hépatocytaire ne sont pas visibles. Seuls quelques noyaux sombres des cellules endothéliales sont visibles (E). Par contre, après un traitement des rats par l'acide tiéniliqne (figure 33), une importante dilatation des sinus veineux (SV) est due à la propriété diurétique de ce médicament. Les hépatocytes ont un aspect normal avec un noyau central contenant un nucléole et de la chromatine et avec la présence de grains cytoplasmiques. L'organisation en travées est respectée. Une différence par rapport au foie de rat témoin vient des cellules endothéliales (E) des sinus veineux, appelées également cellules de Küpffer, à fonction macrophagique. Ces cellules sont ici ballonnées et certaines sont détachées, libres dans les sinus veineux.

Les hépatocytes de rats traités par le clofibrate (figure 34) présentent un aspect différent. L'organisation en travées à partir de la veine centrolobulaire (VCL) persiste mais une souffrance cellulaire est visible. Le cytoplasme est clair, bourré de grains lipidiques ("stéatose"). Les cellules ont une taille irrégulière avec présence de grosses cellules. Certains hépatocytes sont anucléés, d'autres n'ont pas de nucléole et la chromatine n'est pas individualisée. Les sinus veineux sont fins, quoique gorgés de globules rouges (GR). La souffrance cellulaire observée semble toucher plus particulièrement les hépatocytes périportaux que les hépatocytes centrolobulaires : présence de nombreuses cellules de taille irrégulière au cytoplasme clair et non organisées en travées.

Fig. 32 : Coupe de foie de rat témoin.

Coloration à l'Azan de Heidenhain (x 250).

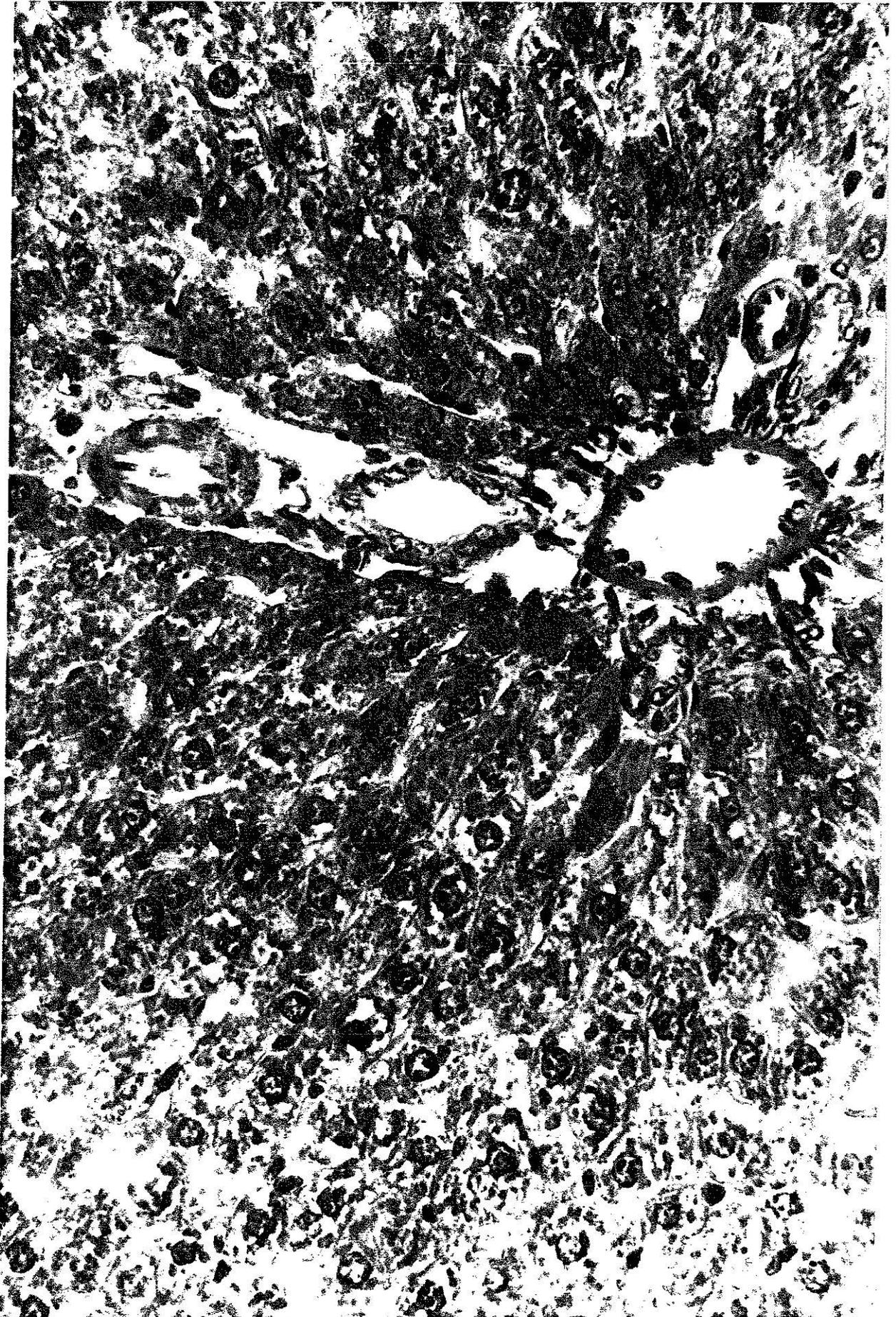
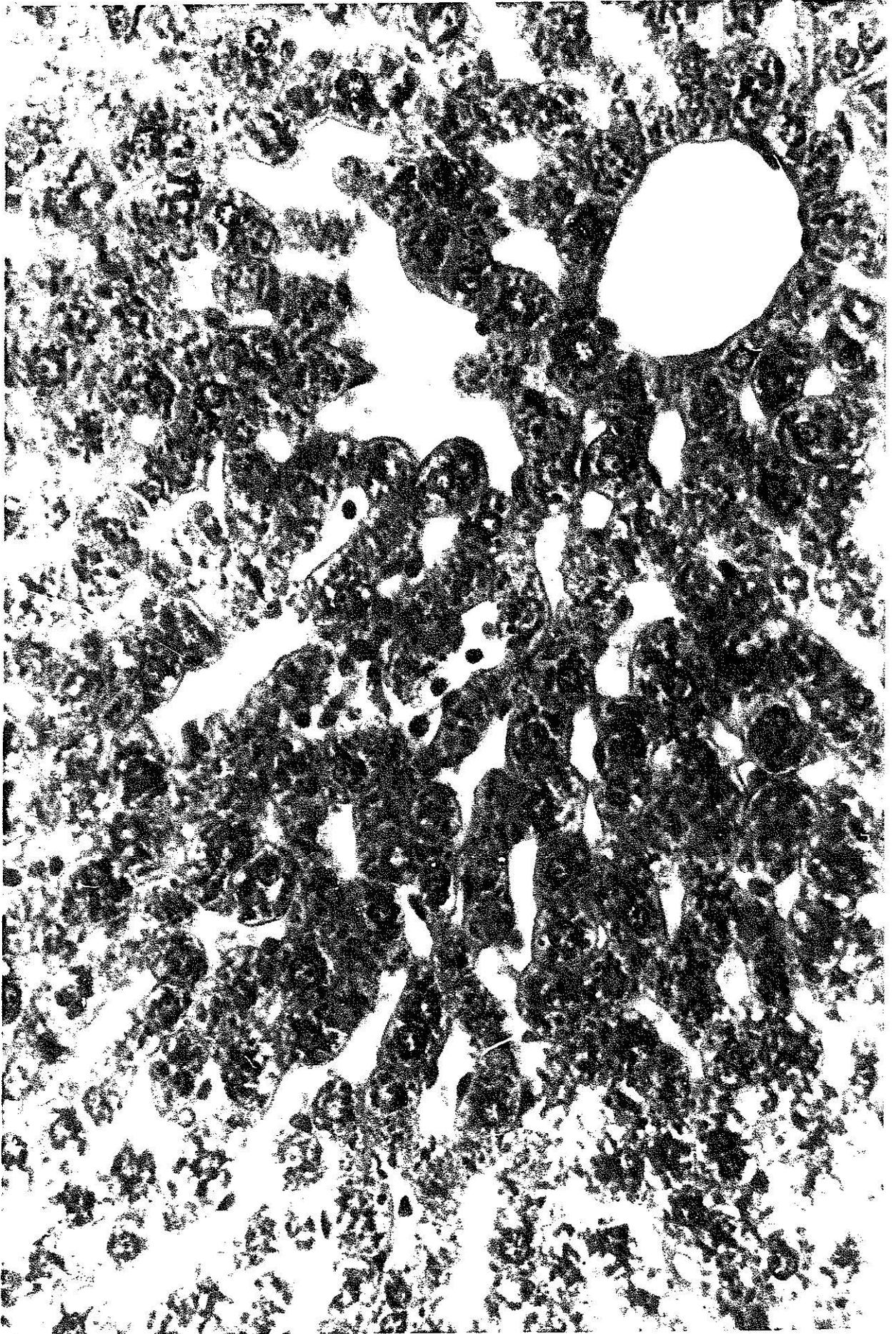




Fig. 33 : Coupe de foie de rat traité par l'acide tiénilique.  
Coloration à l'Azan de Heidenhain (x 250).



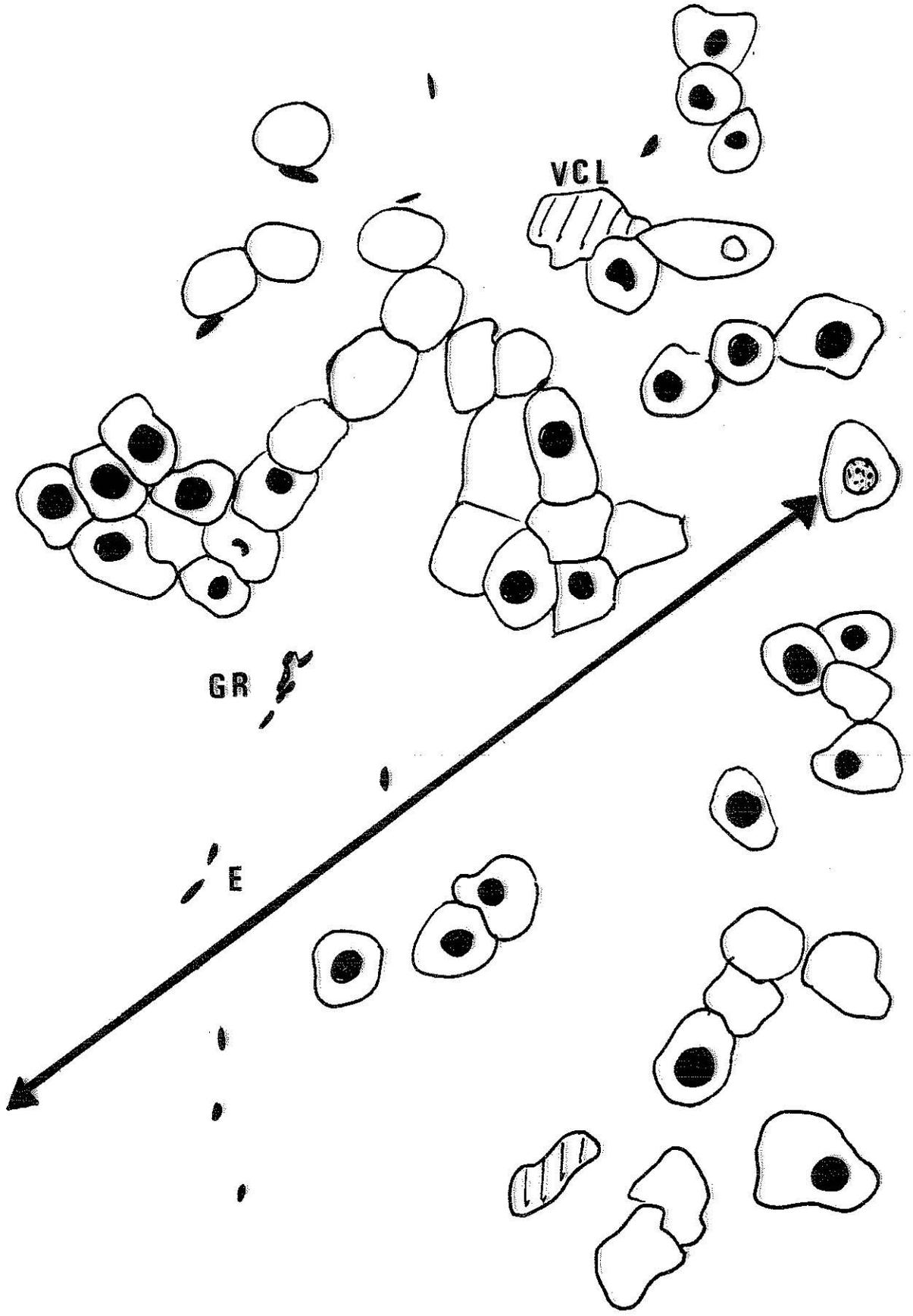
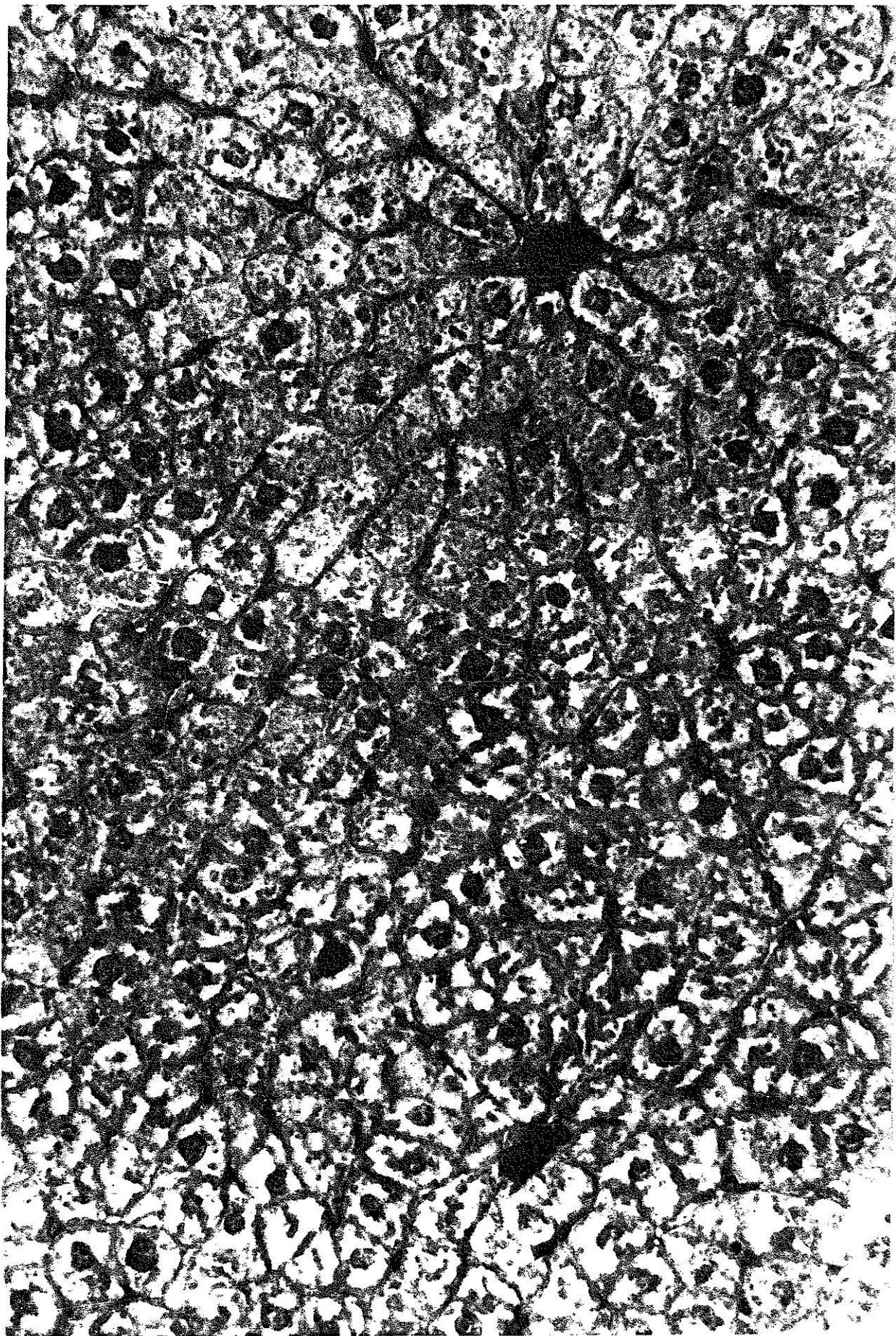


Fig. 34 : Coupe de foie de rat traité par le clofibrate.  
Coloration à l'Azan de Heidenhain (x 250).



Le foie d'un rat ayant subi le double traitement (clofibrate + acide tiénilique) (figure 35) présente des veines très dilatées et riches en globules rouges (GR). Le canal lymphatique (L) est lui-même dilaté et gorgé de lymphocytes. Certains hépatocytes périportaux sont dégénérés ; les cellules sont de taille irrégulière, sans noyau ou avec un noyau pycnotique (signe de nécrose). Par contre, il existe des hépatocytes normaux et fonctionnels dans lesquels le noyau contient un nucléole. L'épithélium du canal biliaire est très aplati et certaines de ses cellules ont desquamé. Le fait remarquable après ce double traitement est l'infiltrat lymphocytaire, phénomène retrouvé généralement lors du déclenchement d'une hépatite (3).

Ces résultats, ainsi que ceux obtenus de la même manière sur des rats traités par PB, TAO, ou BNF, sont résumés dans le tableau 14. Le traitement des rats par l'acide tiénilique a conduit à des anomalies beaucoup plus faibles que celles observées après traitement par BNF ou CLO. Par contre, des anomalies plus nettes et plus nombreuses ont été constatées aussi bien au niveau du foie que du rein lors du double traitement (CLO-AT).

### III.3.3. COMPARAISON DU PROFIL DE RECONNAISSANCE, EN IMMUNO-FLUORESCENCE INDIRECTE SUR COUPES D'ORGANES, DES ANTICORPS ANTI-LKM2 ET DE DIVERS ANTICORPS ANTI-CYTOCHROMES P-450 HEPATIQUES DE RAT

Une autre approche dans la reconnaissance de protéines hépatiques de rat par les anticorps anti-LKM2 a été de comparer le profil obtenu en immunofluorescence indirecte avec ces auto-anticorps à celui de divers anticorps anti-cytochromes P-450 hépatiques de rat (anticorps anti-UT-A, anti-pb1a, anti-pb1b, anti-pb3a et anti-p-452). Les profils de reconnaissance obtenus avec ces anticorps sur coupes de foie et de rein de rat et souris mâles sont résumés dans le tableau 15.

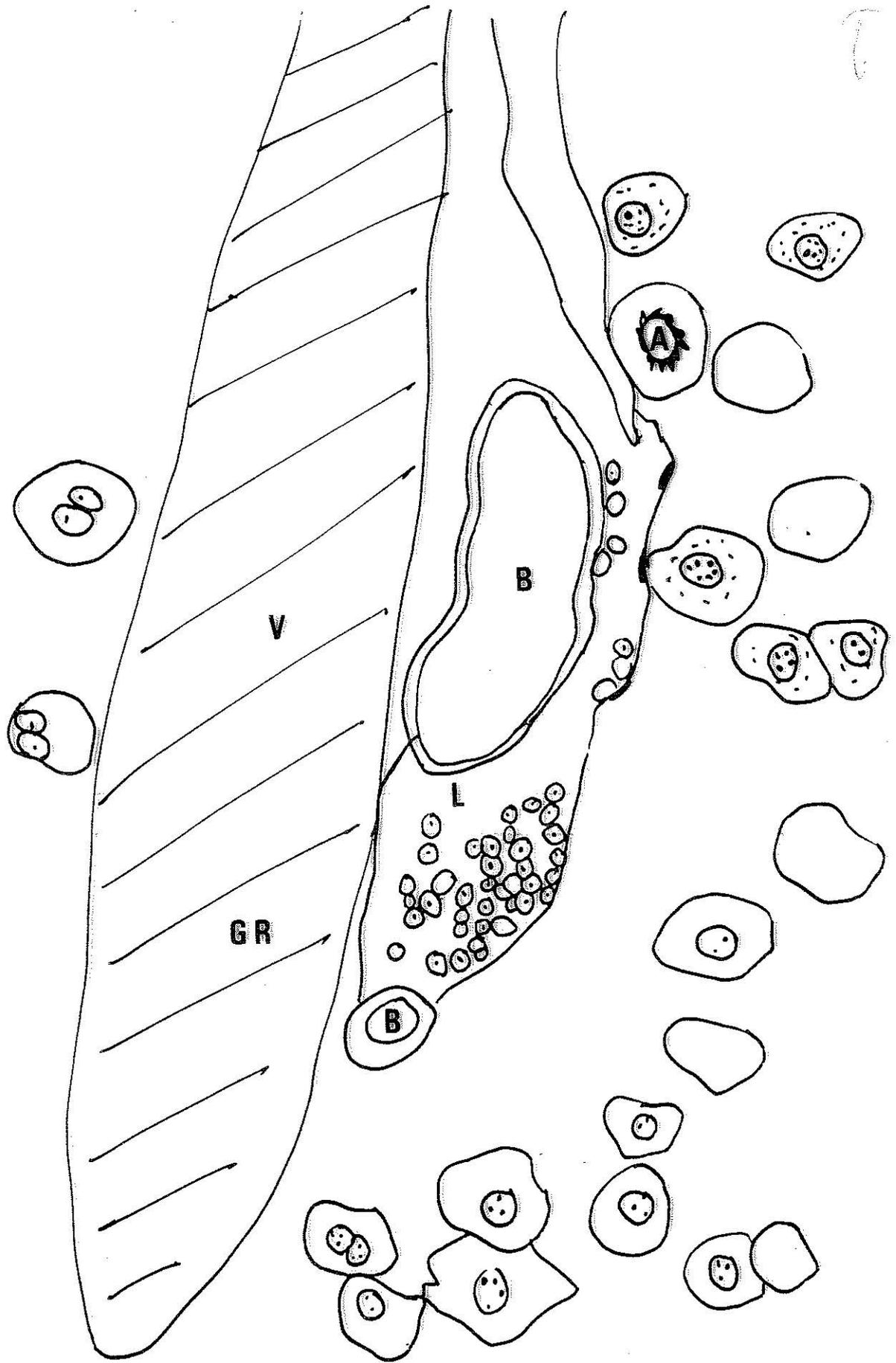


Fig.35 : Coupe de foie de rat traité par le clofibrate puis par l'acide tiénilique.  
Coloration à l'Azan de Heidenhain (x 250).

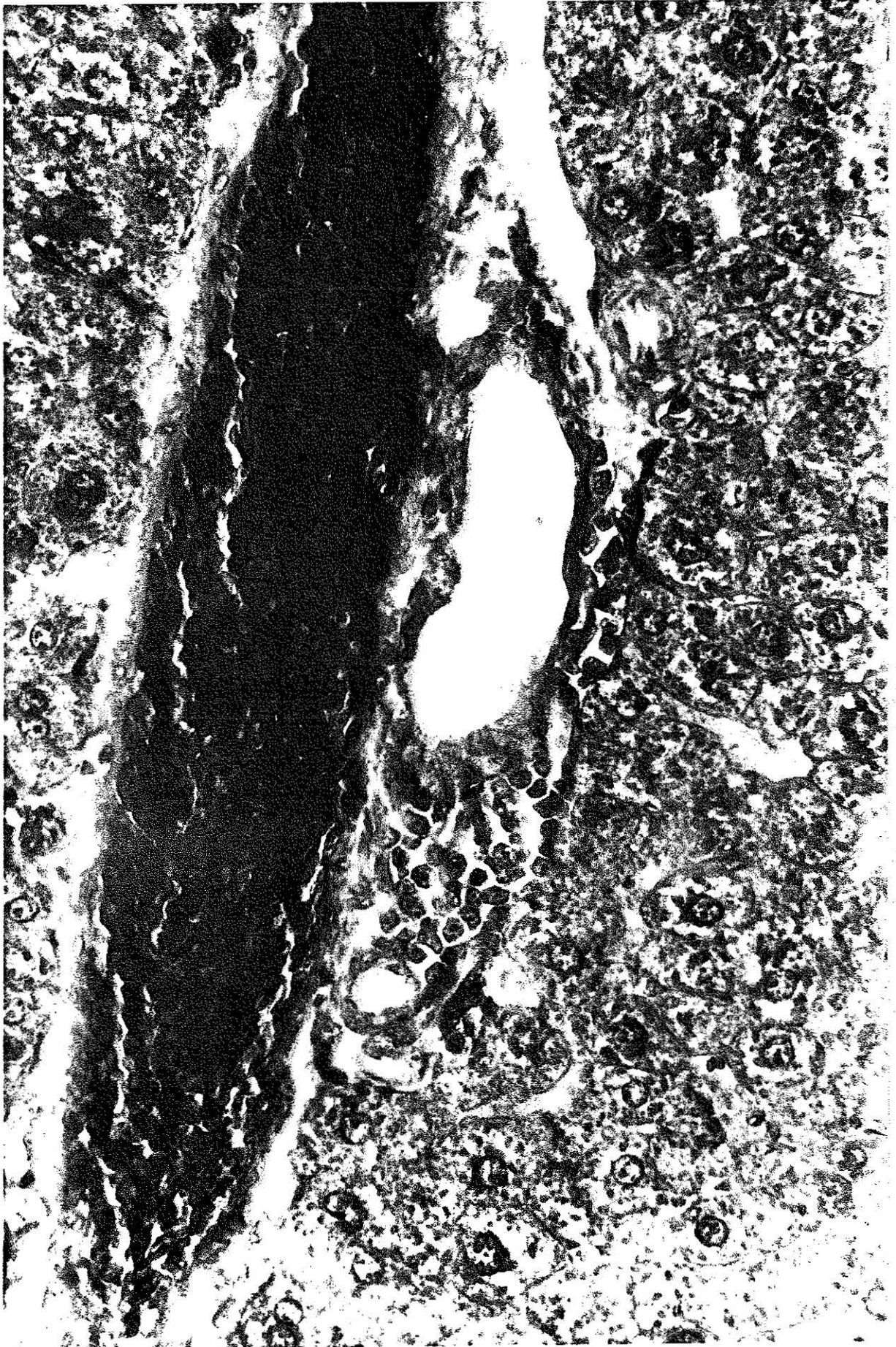


Tableau 14 : Observations histologiques sur le foie et le rein de rats traités

Traitement	F O I E				REIN
	Vascularisation	Infiltration cellulaire	Souffrance cellulaire	Mitose	
PB	-----	NORMAL	-----	-----	-----
TAO	-----	NORMAL	-----	-----	-----
BNF	*	NORMAL	***	*	NORMAL
AT	*	-----NORMAL	-----	-----	-----
CLO	*	NORMAL	*	NORMAL	*
CLO-AT	*	*	*	NORMAL	*

\* : présence de signes anormaux.

Tableau 15 : Comparaison des profils de reconnaissance (en immunofluorescence indirecte) sur coupes d'organes des anticorps anti-LKM et d'anticorps anti-cytochromes P-450 hépatiques de rat.

Anticorps	Rat		Souris	
	Foie	Rein	Foie	Rein
LKM1	+++	p1<p2<p3 p3 +++	+++	p1<p2<p3 p3 +++
LKM2	+++	p1,p2>p3 p1,p2 +++ p3 h	+++ c	p1,p2>p3 p1,p2 +++
UT-A1	++	p1,p2>p3 p1,p2 ++ p3 h	++ c	p1 <u>+</u>
UT-A2	+	p1,p2>p3 p1,p2 ++ p3 h	+ c	p1 <u>+</u>
pb1b	+++	p1=p2=p3 ++	++ c	p1 - p2,p3 +
pb1a	++	p1=p2=p3 +	++ c	-
pb3a	++	p1<p2<p3 p3 +++	++	p1<p2<p3 p3 ++
p-452	+	p1=p2=p3 +	+ c	p1<p2,p3 p2,p3 +

c : hépatocytes centrolobulaires > périportaux

h : hétérogène (aspect de p3)

Reconnaissance en immunofluorescence indirecte de coupes d'organes de rat et de souris mâles par des sérums humains contenant des anticorps anti-LKM1 (LEF), ou anti-LKM2 (JOR) et par des anticorps anti-cytochromes P-450 de rat (anti-UT-A, anti-pb1b, anti-pb1a, anti-pb3a et anti-p-452). Ces sérums ont été utilisés à la dilution 1/20è.

UT-A1 : Laboratoire de R. WOLF

UT-A2 : Laboratoire de J.P. LEROUX.

Il est à remarquer que l'anticorps anti-cytochrome P-450 de rat donnant le profil de reconnaissance le plus proche des anticorps anti-LKM2 est l'anti-P-450-UT-A. En effet, ces deux anticorps ont en commun les caractéristiques suivantes :

- homogénéité de fluorescence des hépatocytes de rat,
- prédominance de la fluorescence des hépatocytes centrolobulaires de souris mâle sur les hépatocytes périportaux,
- fluorescence des  $p_1$  et  $p_2$  de rein de rat supérieure à celle de  $p_3$  et hétérogénéité de la fluorescence des cellules de  $p_3$ .

La seule différence de reconnaissance de ces deux types d'anticorps réside au niveau du rein de souris mâle. Les anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A présentent une réactivité plus faible que les anticorps anti-LKM2 vis-à-vis du rein de souris. Toutefois, les caractéristiques essentielles (énumérées ci-dessus) de reconnaissance en immunofluorescence indirecte des anticorps anti-LKM2 sont retrouvées avec les deux anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A testés provenant de deux laboratoires différents (celui de R. WOLF, Edimbourg et celui de J.P. LEROUX, Paris). Les autres anticorps anti-cytochromes P-450 de rats testés ne montrent pas le même profil de reconnaissance que les anticorps anti-LKM2. Les anticorps anti-pb1b, anti-pb1a et anti-p-452 présentent une fluorescence homogène de  $p_1$ ,  $p_2$  et  $p_3$  de rein de rat. L'anticorps anti-pb3a montre quant à lui le même profil de reconnaissance que les anticorps anti-LKM1, présents dans le sérum de malades ayant une hépatite chronique active ( $p_1 < p_2 < p_3$  et fluorescence homogène des hépatocytes de souris mâles).

#### III.4. CONCLUSION

L'étude de la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 de microsomes hépatiques de rat a été réalisée à partir de trois approches différentes.

Tout d'abord, nous avons montré par des techniques d'immuno-transfert que les anticorps anti-LKM2 reconnaissent trois cytochromes P-450 de rat purifiés : les cytochromes P-450-pb2a (UT-A, IIC11), pb3a (PB-B, IIB1) et pb3b (PB-D, IIB2). Ces protéines sont présentes au niveau des fractions microsomales hépatiques de rat. Elles sont donc reconnues par les anticorps anti-LKM2 dans les microsomes de rats témoins ou traités par le phénobarbital ou le clofibrate pour le cytochrome P-450-UT-A (IIC11) et spécifiquement dans les microsomes de rats induits par le phénobarbital pour les cytochromes P-450-PB-B (IIB1) et PB-D (IIB2). Ces résultats sont en accord avec des résultats préliminaires obtenus en collaboration avec P. BEAUNE (70) montrant que les anticorps anti-LKM2 reconnaissent le cytochrome P-450-UT-A (IIC11) ainsi qu'une forme induite par le phénobarbital, le cytochrome P-450-PB-B (IIB1). Une étude réalisée par WAXMAN et coll. (71) a montré, en utilisant d'autres sérums contenant des anticorps anti-LKM2 et une autre technique sans dénaturation des protéines (cf. III.1, p. 60), que les anticorps anti-LKM2 reconnaissent les cytochromes P-450-UT-A (IIC11), UT-F (IIA1) et PB-C (IIC6). Une réactivité croisée entre les anticorps anti-LKM2 et une forme constitutive de cytochrome P-450 de rat, le cytochrome P-450-UT-A (IIC11) a été également montrée par cette équipe. Les différences observées quant à la reconnaissance par ces sérums d'autres cytochromes P-450 peuvent être expliquées par la différence de techniques et de sérums utilisés mais aussi par le fait que les anticorps anti-LKM2 ne doivent reconnaître que de façon minoritaire ces autres cytochromes P-450 de rat.

Cette différence de reconnaissance par les sérums entre protéine native et protéine dénaturée a également été observée dans cette même étude de WAXMAN et coll., avec les anticorps anti-LKM1 présents dans le sérum de malades ayant fait une hépatite chronique active. En effet, il a montré, par la technique d'immuno-transfert, que les anticorps anti-LKM1 reconnais-

saient une forme constitutive de cytochrome P-450 présente dans les microsomes de rat témoins ou traités par la  $\beta$ -naphthoflavone ou le clofibrate mais fortement diminuée dans les microsomes de rats traités par le phénobarbital ou l'isosafrole.

Or, ces mêmes anticorps révèlent en "dot-blot" les cytochromes P-450 purifiés de foie de rat ISF-G (IA2) et BNF-B (IA1). Ces auteurs suggèrent que ces deux formes partagent des épitopes communs avec une forme constitutive, mais, curieusement, cette forme n'est pas révélée par les sérums en "dot-blot". Une autre étude, effectuée par le groupe d'ALVAREZ (76) a montré que les anti-LKM1 reconnaissent chez le rat des cytochromes P-450 de la sous-famille IID. Quelques divergences apparaissent donc dans la littérature en ce qui concerne la réactivité croisée entre anticorps humains et protéines hépatiques de rat.

Nos résultats montrent que la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 de protéines microsomales de foie humain est plus simple que celles de rat. Ces anticorps ne reconnaissent qu'une seule protéine, identifiée comme étant le cytochrome P-450-8 (IIC)(55). Un phénomène analogue vient d'être publié en ce qui concerne les anticorps anti-LKM1. Ces anticorps reconnaissent spécifiquement une protéine hépatique humaine, le cytochrome P-450 buf I ou II (77), ou db I (78), de la sous-famille IID.

La deuxième approche que nous avons utilisée afin de déterminer les protéines hépatiques de rat reconnues par les anticorps anti-LKM2 a consisté à tester la capacité de ces anticorps à inhiber la transformation de l'acide tiénilique ou de son isomère en métabolites réactifs. L'implication du cytochrome P-450-UT-A (IIC11) semble donc confirmée car les anticorps

anti-LKM2 inhibent de l'ordre de 30 à 40 % la fixation covalente du CRE 4316 sur les protéines microsomales de rats témoins ou traités par le phénobarbital ou la cyano-16 $\alpha$ -pregnenolone.

L'absence d'inhibition par ces anticorps, observée dans le cas de microsomes de rats induits par le clofibrate, est expliquée par le fait que, dans ces microsomes, un cytochrome P-450 différent du cytochrome P-450-UT-A est majoritairement responsable de l'activation métabolique de l'acide tiénilique ou de son isomère. Ce cytochrome P-450, induit spécifiquement par le clofibrate, ne serait pas reconnu par les anticorps anti-LKM2.

La troisième approche a été d'étudier la reconnaissance, en immunofluorescence indirecte, par les sérums contenant des anticorps anti-LKM2, de coupes de foie de rats traités. Les résultats obtenus suggèrent que la reconnaissance des coupes de foie de rat par ces sérums se fait majoritairement par l'intermédiaire d'une protéine (un cytochrome P-450) présente chez des animaux témoins et subsistant chez les animaux traités par différents inducteurs. Cela explique les très faibles différences observées dans la révélation par les anticorps anti-LKM2 de coupes de foie de rats différemment traités.

De plus, les profils de reconnaissance très proches obtenus avec les anticorps anti-LKM2 et les anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A suggèrent que la protéine commune aux différents foies de rat est bien le cytochrome P-450-UT-A (IIC11). Un autre argument en cette faveur est la non-reconnaissance de coupes de foie foetal par ces anticorps, ce cytochrome étant absent chez le foetus.

L'ensemble de ces résultats montre que la protéine hépatique de rat majoritairement reconnue par les anticorps anti-

LKM2 est le cytochrome P-450-UT-A (IIC11). L'analogie entre ce cytochrome P-450 hépatique de rat et le cytochrome P-450-8 de foie humain, est compréhensible si l'on compare les séquences de ces deux protéines. Nous avons effectué, avec l'aide de F. SCHOENTGEN, que nous remercions ici, une recherche dans une banque de données des séquences de ces protéines que nous avons, par traitement informatique, comparées entre elles. La figure 36 montre tout d'abord l'homologie de séquence (77 %) existant entre les protéines hépatiques humaines de la sous-famille IIC (le cytochrome P-450-8 n'étant pas identifié à l'intérieur de cette sous-famille). La figure 37 compare la séquence entre un cytochrome P-450 humain de cette sous-famille IIC au cytochrome P-450-UT-A (IIC11) de rat ; il est alors noté qu'elles sont homologues à 76 %.

L'existence d'une réactivité croisée entre les anticorps anti-LKM2 et les protéines hépatiques de rat va pouvoir nous permettre d'utiliser ces auto-anticorps comme outils dans les études ultérieures explorant le mécanisme proposé pour l'apparition des anticorps anti-LKM2.

Fig. 36 : Homologie de séquence entre cytochromes P-450 humains de la famille méphénytoïne (IIC8 et IIC10).

```

      10      20      30      40      50      60      70
VLVLCLSFMLLFSLWRQSCRRRKLPPGPTPLPIIGNMLQIDVKDICKSFTNFSKVYGPVFTVYFGMNPV
=====
VLVLCLSCLLLL SLWRQSSGRGKLPVIGNILQIGIKDISKSLTNLSKVYGPVFTLYFGLKPIV
      10      20      30      40      50      60      70
      80      90      100     110     120     130     140
VFHGYEAVKEALIDNGEEFSGRGNSPISQRITKGLGISSNGKRWKEIRRFSLTNLRNFGMGKRSIEDRV
=====
VLHGYEAVKEALIDLGEEFSGRGIFPLAERANRFGVIVSNGKKWKEIRRFSLMTRLNFGMGKRSIEDRV
      80      90      100     110     120     130     140
      150     160     170     180     190     200     210
QEEAHCLVEELRRTKASPCDPTFILGCAPCNVICSVVFKRFDYKQNFLLMKRFNENFRILNSPWIV
=====
QEEARCLVEELRRTKASPCDPTFILGCAPCNVICSIIFHKRFDYKQGFNLMEKLNENIKILSSPWIGI
      150     160     170     180     190     200     210
      220     230     240     250     260     270     280
CENNFPLLIDCFPGTHNKVLKNVALTRSYIREKVKHEHQASLDVNNPRDFMDCFLIKMEGEKDNQKSEFNIE
=====
CENNFSPIIDYFPGTHNKLLKNVAFMKSYLEKVKHEHQESMDMNNPQDFIDCFMLKMEKEKHNPSEFTIE
      220     230     240     250     260     270     280
      290     300     310     320     330     340     350
NLVGTVADLFVAGTETTSTTLRYGLLLLLKHPEVTAKVQEEIDHVI GRHRSPCMQDRSHMPYTDVVHEI
=====
SLENTAVDLFGAGTETTSTTLRYALLLLLKHPEVTAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRSHMPYTDVVHEV
      290     300     310     320     330     340     350
      360     370     380     390     400     410     420
QRYSDLVPTGVPHAVTTDTKFRNYLIPKGTTIMALLTSVLHODKEFPNPNI FDPGHFLDKNGNFKKSDYF
=====
QRCIDLLPTS LPHAVTCDIKFRNYLIPKGTTLISLTSVLHONKEFPNPEMFDPHHFLDEGDNFKKSKYF
      360     370     380     390     400     410     420
      430     440     450     460     470     480     490
MPFSAGKRICAGEGLARMELFLFTTILQNFNLKSVDDLKLNLTAVTKGIUSLPPSYQICFIPV
=====
MPFSAGKRICVGEALAGMELFLFTSILQNFNLKSLVDPKNLDTTPVUNGFASVPPFYQLCFIPV
      430     440     450     460     470     480

```

tel-00653612, version 1 - 19 Dec 2011

- = acide aminé identique
- acide aminé de même hydrophobicité.
- acide aminé différent

Fig. 37 : Homologie de séquence entre cytochrome P-450 humain (IIC10) et cytochrome P-450-UT-A (IIC11) de foie de rat.

```

      10      20      30      40      50      60      70
VLVLCLSCLLLL SLWRQSSGRGKLP PGPTPLPVI GNILQIGIKDISKSLTNLSKVYGPVFTLYFGLKPIV
=====
VLVLTLSLLLLL SLWRQSFGRGKLP PGPTPLPII GNTLQIYMKDIGQSIKKFSKVYGPIFTLYLGMKPFV
      10      20      30      40      50      60      70
      90      90      100     110     120     130     140
VLHGYEAVKEALIDLGE EFSGRGIFPLAERANR GFGIVFSNGK KWKEIRRFSLM TLRNFGMGKRSIEDRV
=====
VLHGYEAVKEALVDLGE EFSGRGSFPVSE RYV NKGLGVI FSNGMQWKEIRRF SIMTLR TFGMGKRTIEDRI
      80      90      100     110     120     130     140
      150     160     170     180     190     200     210
QEEARCLVEELR KTKASPCDPTFILGC APCNVICSIIFHK RFDYKDQQFLN LMEKLNENIKI LSSPWIQI
=====
QEEAQC LVEELR KSKGAPDPTFILGC APCNVICSIIFQ NRFDYKDPTFLN LMHRFNENFRL FSSPWLQV
      150     160     170     180     190     200     210
      220     230     240     250     260     270     280
C NNFSP I IDYFP GTHNKL LKNVAFM KSYILEK VKEHQES MD MNPQDFI DCFLMKME KEKHNQ PSEFTIE
=====
C NTFPAI I DYFP GSHNQV LKNFFYI KNYVLEK VKEHQES LDKDN PRDFI DCFLNKME QEKHNQ PSEFTLE
      220     230     240     250     260     270     280
      290     300     310     320     330     340     350
S LENTAV D LFGAGT ETTSTTL RYALLLLL KHPEVTAKV QEEIERVI GRNRSP CMQDRSH MPYTD AUVHEV
=====
S LVATV TDMFGAG TETTSTTL RYGLLLL KHVDVTAKV QEEIERVI GRNRSP CMKDRS QMPYTD AUVHEI
      290     300     310     320     330     340     350
      360     370     380     390     400     410     420
Q RCI D LLPTSL PHAVTCDI KFRNYL I PKGTTI LISLTS ULHDNKE FPNPEM FDPHHFL DEGDNF KFKSKYF
=====
Q RYI D LVPTNL PHLVTR DIKFRNY FIPKG TNVIVS LSSILH DDKEFP NPEKFD PGGHFL DERGNF KFKSDYF
      360     370     380     390     400     410     420
      430     440     450     460     470     480
M PFSAGK RICVGE ALAGMEL FLFTSIL QNFNLK SLVDPK NLD TTPV WNGFAS VPPFYQL CFI PV
=====
M PFSAGK RICAGE ALARTE LFFTTI LQNFNLK SLVDVK DITTPA I SGFGHL PPFYEAC FIPV
      430     440     450     460     470     480     490

```

- = acide aminé identique
- acide aminé de même hydrophobicité.
- acide aminé différent

## CHAPITRE IV

Etude de l'apparition de nouveaux antigènes à la surface d'hépatocytes de rats traités par l'acide tiénilique

## OBJECTIFS

Dans le chapitre précédent, nous avons montré une réactivité croisée entre anticorps anti-LKM2 et protéines hépatiques de rats. Dans la mesure où l'hypothèse émise dans le chapitre I, pour l'apparition des anticorps anti-LKM2, suppose l'intervention d'un néo-antigène membranaire (étape 4 de la figure 12, p. 35 ), nous avons utilisé cette réactivité croisée pour mettre en évidence l'éventuelle apparition d'un nouvel antigène à la surface des hépatocytes de rats traités par l'acide tiénilique. En fait, d'après le mécanisme de la figure 12, le néo-antigène pourrait être un cytochrome P-450 alkylé d'où deux possibilités de reconnaissance de ce néo-antigène :

- la protéine elle-même est reconnue par les anticorps anti-LKM2,
- l'haptène, dérivé de l'acide tiénilique, pourrait être détecté.

C'est d'ailleurs ce qui se produit dans le cas de l'halothane où les anticorps anti-LKM1 sont dirigés contre deux protéines hapténisées, un cytochrome P-450 (48) et une carboxyl-estérase (79). Deux approches sont donc possibles :

- 1) Un traitement des rats par l'acide tiénilique peut-il faire apparaître un nouvel antigène, à la surface des hépatocytes, détectable par les anticorps anti-LKM2 ?
- 2) Par analogie avec la littérature (cas de l'halothane), un haptène dérivé de l'acide tiénilique peut-il être détecté par un anticorps anti-acide tiénilique à la surface d'hépatocytes de rats traités par l'acide tiénilique?

Tout au long de ce chapitre, nous allons nous efforcer de répondre à ces deux questions.

#### IV.1. ÉTUDE DE L'APPARITION DE NOUVEAUX ANTIGÈNES À LA SURFACE D'HÉPATOCTES DE RATS TRAITÉS

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'Henri HOELLINGER (INSERM, UA.400) et, plus particulièrement, avec Michelle SONNIER.

Dans cette étude, il a été utilisé la réactivité croisée entre anticorps anti-LKM2 et protéines hépatiques de rat pour montrer, après traitement des animaux par l'acide tiénilique, une éventuelle apparition de nouveaux antigènes reconnus par les anticorps anti-LKM2 à la surface de leurs hépatocytes. Pour cela, un test en immunofluorescence a été mis au point sur hépatocytes isolés de rat.

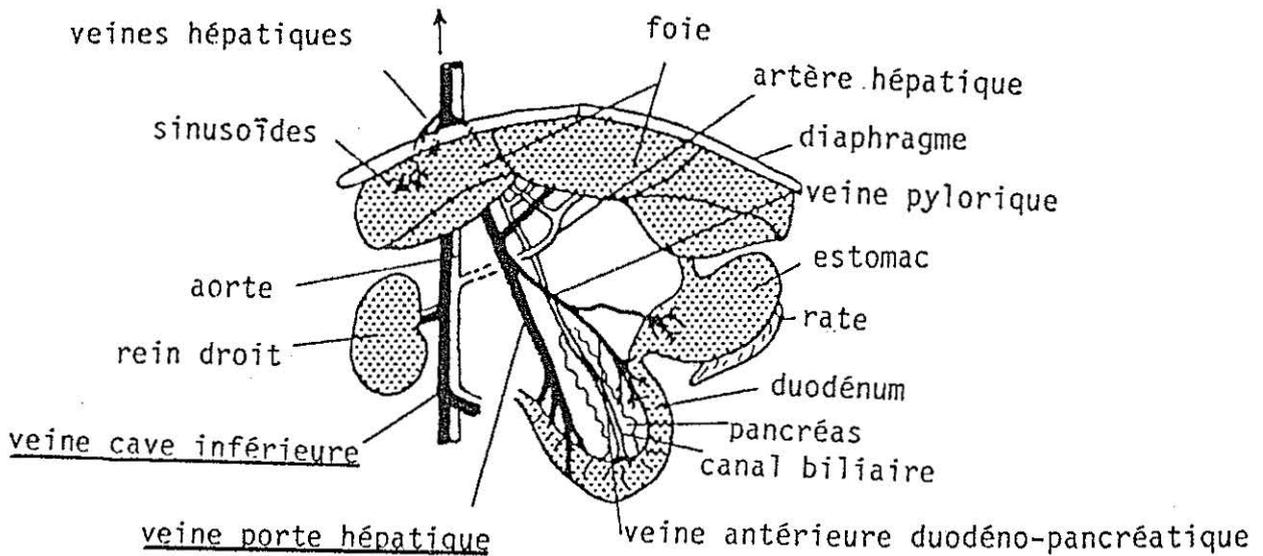
##### IV.1.1. INFLUENCE DU TRAITEMENT DES RATS SUR LA RECONNAISSANCE EN IMMUNOFLOUORESCENCE DE LEURS HEPATOCYTES PAR LES ANTICORPS ANTI-LKM2

Pour cette étude, les rats sont traités par l'acide tiénilique seul ou après prétraitement par divers produits connus pour induire différents types de cytochromes P-450.

Après sacrifice des animaux, leurs hépatocytes ont été isolés par une méthode enzymatique classique (68) de perfusion du foie par la collagénase au niveau de la veine cave (le perfusat est recyclé après sa sortie par la veine porte). La figure 38 montre le passage du liquide de perfusion au niveau des différents lobes hépatiques.

La reproductibilité de cette technique a été vérifiée. Le nombre d'hépatocytes obtenus après chaque perfusion de foie de rat était constant (environ  $10^8$  hépatocytes). La mesure de viabilité des hépatocytes isolés, effectuée par la méthode

Fig. 38 : Cavité abdominale du rat.

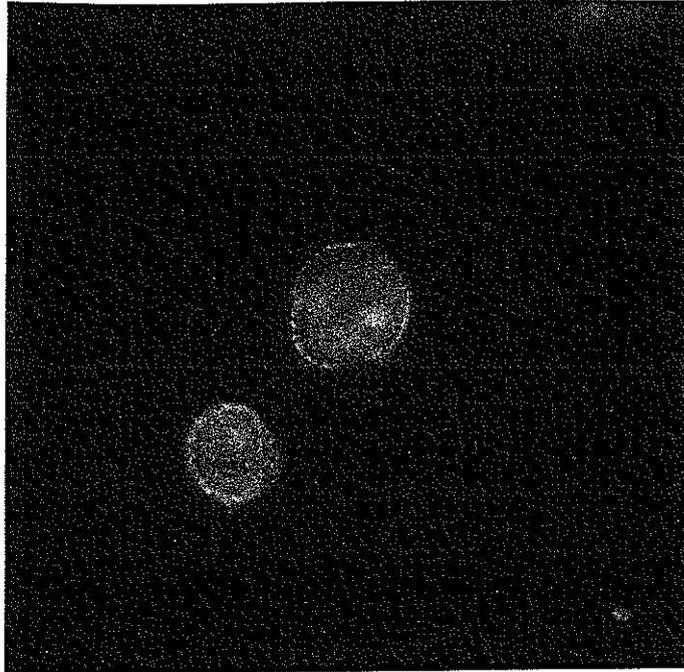


d'exclusion du bleu Trypan (le colorant ne pénètre que dans les cellules mortes) a toujours donné un résultat compris entre 85 et 90 % de viabilité. Un isolement mécanique des hépatocytes (80) ne convient pas, car il conduit à 0 % de viabilité. Ce fait a également été observé par GERKEN et coll. (81) qui ont montré que l'intégrité membranaire n'était alors pas préservée.

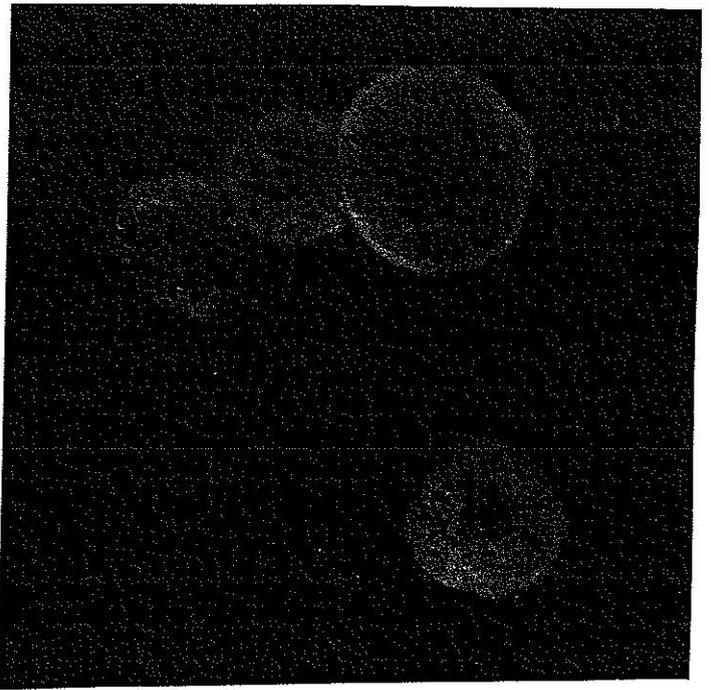
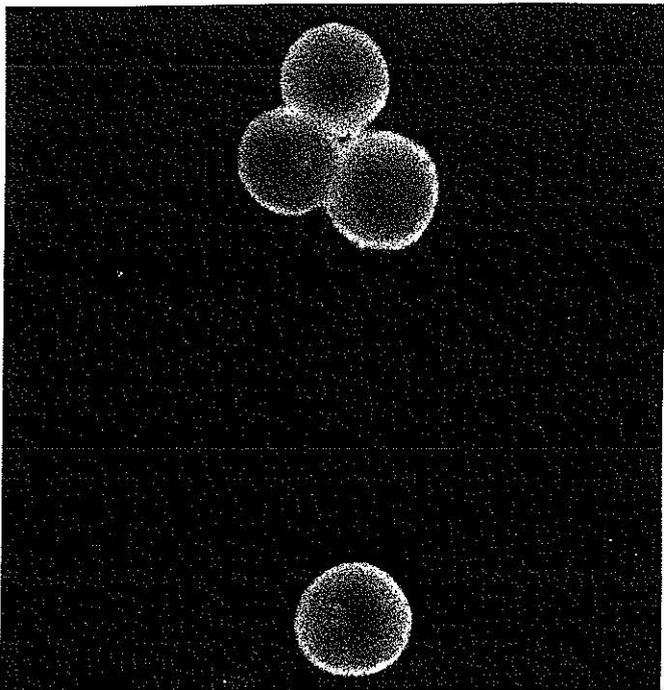
Après l'isolement des hépatocytes, le problème qui s'est posé, est de savoir s'il faut ou non fixer ces hépatocytes afin de stabiliser la membrane cellulaire. Le fixateur ne doit pas altérer les antigènes de surface ni perméabiliser la membrane plasmique. Après différents essais, le mélange de fixation composé de 4 % de paraformaldéhyde + 0,05 % de glutaraldéhyde (82), s'est révélé respecter ces critères. Les résultats obtenus en immunofluorescence sur les hépatocytes fixés ont été très analogues à ceux obtenus sur hépatocytes non fixés. Cependant,

Fig.39 : Immunofluorescence indirecte des anticorps anti-LKM2 sur hépatocytes de rats traités par le clofibrate, puis par l'acide tiénilique : comparaison des résultats obtenus avec des hépatocytes fixés ou non.

a) Image obtenue sans fixation préalable des hépatocytes.



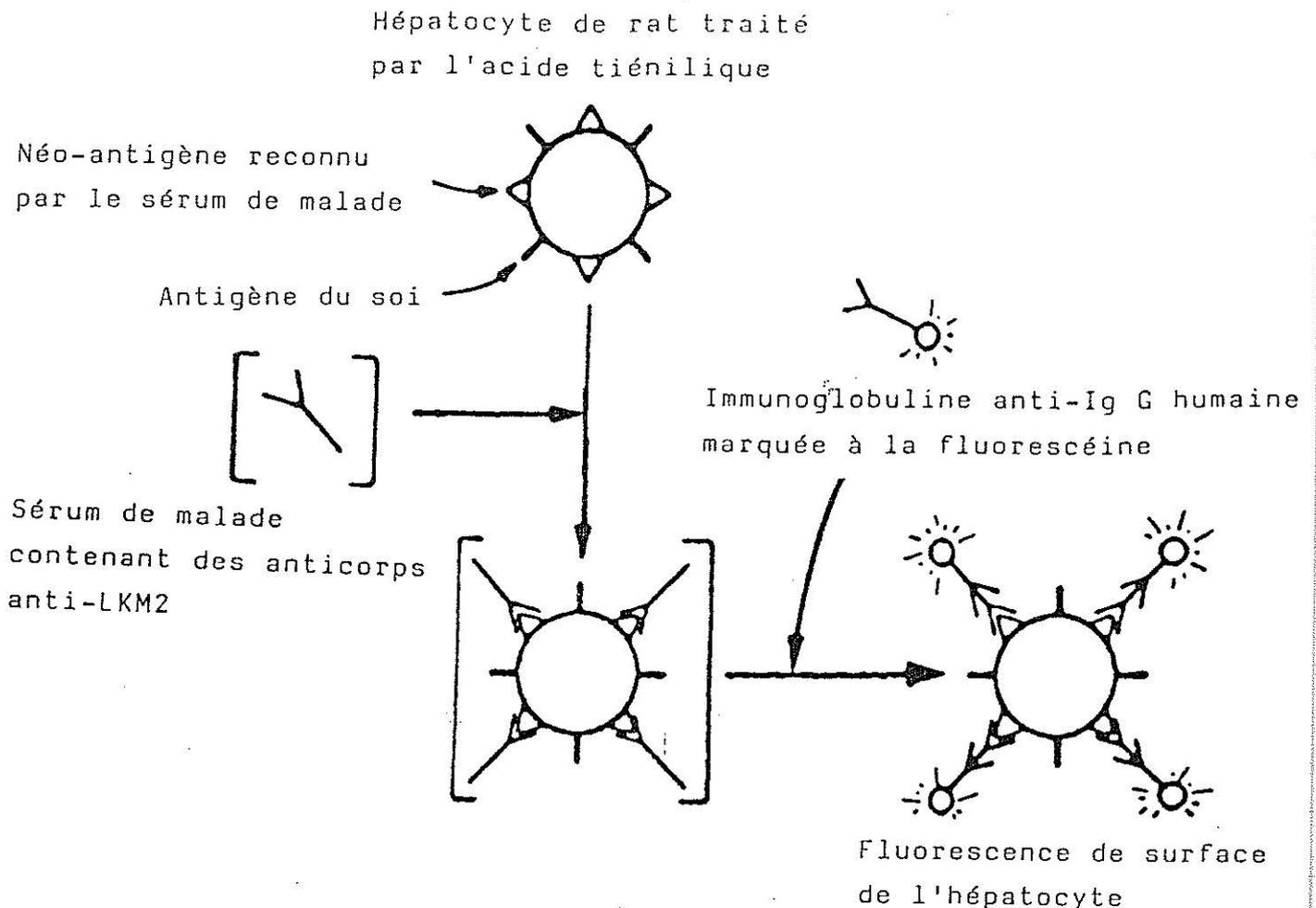
b) Images obtenues à deux grossissements différents après fixation des hépatocytes.



une intensité de fluorescence supérieure a été notée après fixation, ce qu'illustre la figure 39 sur laquelle peuvent être vus les hépatocytes de rats traités par le clofibrate puis l'acide tiénilique révélés par le sérum JOR (contenant des anticorps anti-LKM2), en immunofluorescence indirecte, après ou sans fixation. La fluorescence observée est granulaire et située au niveau de la membrane hépatocyttaire. Ce type de fluorescence est comparable à celle détectée en cas de présence d'antigènes membranaires à la surface d'hépatocytes (83). Par la suite, ne seront montrés que les résultats obtenus après fixation des hépatocytes.

Le test d'immunofluorescence, après l'isolement et la fixation des hépatocytes, est réalisé selon le principe décrit dans la figure 40.

Fig. 40 : Principe de la détection des antigènes de surface hépatocyttaire par immunofluorescence indirecte.



Les hépatocytes de rats sont tout d'abord incubés en présence du sérum à tester (sérum contenant des anticorps anti-LKM2 par exemple), puis, dans un second temps, en présence d'immunoglobulines, anti-IgG humaines marquées à la fluorescéine. Si le sérum testé contient des anticorps reconnaissant un antigène membranaire, une fluorescence de surface des hépatocytes doit apparaître.

Outre la fixation des hépatocytes, un autre problème s'est posé concernant l'utilisation des sérums eux-mêmes. En effet, les composants de ces sérums se fixeraient de façon non spécifique (parallèlement au problème étudié) sur les hépatocytes en général et donc, sur ceux de rats témoins. Pour éliminer cette fixation, les sérums, après décomplémentation par chauffage 1 h à 56°C afin d'éviter une éventuelle lyse cellulaire par le complément, sont adsorbés sur hépatocytes de rat témoin avant d'être testés sur hépatocytes de rats traités (80). Aucune différence de fluorescence n'est notée entre un sérum adsorbé ou non, phénomène déjà décrit pour les anticorps anti-LKM1 (81).

Après cette mise au point pour régler ces problèmes technique, plusieurs études sont réalisées sur la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 de la membrane d'hépatocytes de rats différemment traités. Dans un premier temps, les rats sont traités par un inducteur de cytochromes P-450 (PB, CLO, FEN, TAO, 3MC) ou par l'acide tiénilique ou son isomère. Le tableau 16 regroupe les résultats obtenus.

Quelques observations sont à relever : les sérums humains utilisés comme sérums témoins, ne contenant pas d'anticorps anti-LKM2, sont testés sur les différents hépatocytes et ne conduisent jamais à l'apparition d'une fluorescence. Il en est de même si les hépatocytes sont directement incubés en présence d'immunoglobulines anti-IgG humaines marquées à la fluorescéine.

La troisième remarque concerne la lecture des lames effectuée par trois personnes différentes, et de façon indépendante. L'évaluation de l'intensité de la fluorescence étant qualitative (nombre de +), cette lecture par trois personnes permet de donner des résultats les plus objectifs possibles. Pour une même expérience, les intensités déterminées par les différents lecteurs sont très proches, voire identiques. Trois sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 (KUT, JOR et TAY) ont été testés sur les hépatocytes des différents rats. Ces sérums se comportant de façon identique (même intensité de fluorescence), les résultats sont donnés pour les anticorps anti-LKM2 dans leur ensemble.

La lecture du tableau 16 signale tout d'abord que les anticorps anti-LKM2 ne reconnaissent aucune protéine à la surface des hépatocytes de rats non traités (-)

La même observation est faite lors de 4 expériences indépendantes, sur des hépatocytes de rats différents, et avec trois sérums humains (KUT, JOR et TAY).

Un traitement des rats par un inducteur classique de cytochromes P-450 (PB, CLO, FEN, TAO, 3MC) n'améliore pas la reconnaissance de ces hépatocytes par les anticorps anti-LKM2 (-). Par contre, un traitement des rats par l'acide tiénilique ou son isomère (CRE 4316) montre, de façon équivalente, une légère reconnaissance (+) de ces hépatocytes par les anticorps anti-LKM2. La fluorescence observée est membranaire, de faible intensité (+ le plus souvent), mais significative par rapport à l'ensemble du tableau.

L'obtention d'une réponse, même faible, chez des rats traités par l'acide tiénilique, permet de montrer qu'il peut y avoir apparition de nouveaux antigènes à la surface d'hépatocytes de rats sous l'influence d'un traitement.

Tableau 16 : Reconnaissance (en immunofluorescence) par les anticorps anti-LKM2 d'hépatocytes de rats différemment traités.

Traitement	TEM	PB	CLO	FEN	TAO	3MC	AT	CRE 4316
Expérience 1								
lecteur 1	-	<u>+</u>	-	-	-	-	+	+
lecteur 2	-	-	<u>+</u>	-	<u>+</u>	-	<u>+</u>	+
lecteur 3	-	-	-	-	-	<u>+</u>	+	<u>+</u>
Expérience 2								
lecteur 1	<u>+</u>	-	<u>+</u>	-	-	-	+	++
lecteur 2	-	-	-	-	-	-	<u>+</u>	+
lecteur 3	-	-	-	-	-	-	+	+
Expérience 3								
lecteur 1	-		-				++	
lecteur 2	-		-				+	
lecteur 3	<u>+</u>		-				+	
Expérience 4								
lecteur 1	-		-				+	
lecteur 2	-		-				<u>+</u>	
lecteur 3	-		-				<u>+</u>	

Intensité de fluorescence (++ > + > + > -) observée après incubation d'hépatocytes de rats différemment traités en présence de sérum humain contenant des anticorps anti-LKM2 (KUT, JOR, ou TAY au 1/25<sup>e</sup>), puis d'immunoglobulines anti-IgG humaines marquées à la fluorescéine (au 1/100<sup>e</sup>). Chaque expérience est réalisée indépendamment des autres, sur des hépatocytes de rats différents, et observée par trois lecteurs. Les sérums humains témoins testés ne contenant pas d'anticorps anti-LKM2; aucune fluorescence n'apparaît.

Il a ensuite été envisagé d'augmenter cette réponse et pour cela les rats ont été traités par des inducteurs classiques de cytochromes P-450 avant l'administration de l'acide tiénili-que lui-même. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 (en immunofluorescence) d'hépatocytes de rats induits puis traités par l'acide tiénili-que ou son isomère.

Traitement	AT	CRE 4316	PB AT	CLO AT	FEN AT	TAO AT	3MC AT	CLO CRE 4316
Expérience 1								
lecteur 1	+	+	+	+++	<u>+</u>	+	-	+
lecteur 2	<u>+</u>	+	<u>+</u>	++	+	-	-	++
lecteur 3	+	<u>+</u>	<u>+</u>	+++	-	<u>+</u>	<u>+</u>	+
Expérience 2								
lecteur 1	+	++	<u>+</u>	++	<u>+</u>	<u>+</u>	-	++
lecteur 2	<u>+</u>	+	<u>+</u>	+	<u>+</u>	<u>+</u>	-	+
lecteur 3	+	+	<u>+</u>	++	-	-	<u>+</u>	+
Expérience 3								
lecteur 1	++			++				+
lecteur 2	+			+++				++
lecteur 3	+			+++				+
Expérience 4								
lecteur 1	+			+++				
lecteur 2	<u>+</u>			+++				
lecteur 3	<u>+</u>			+++				

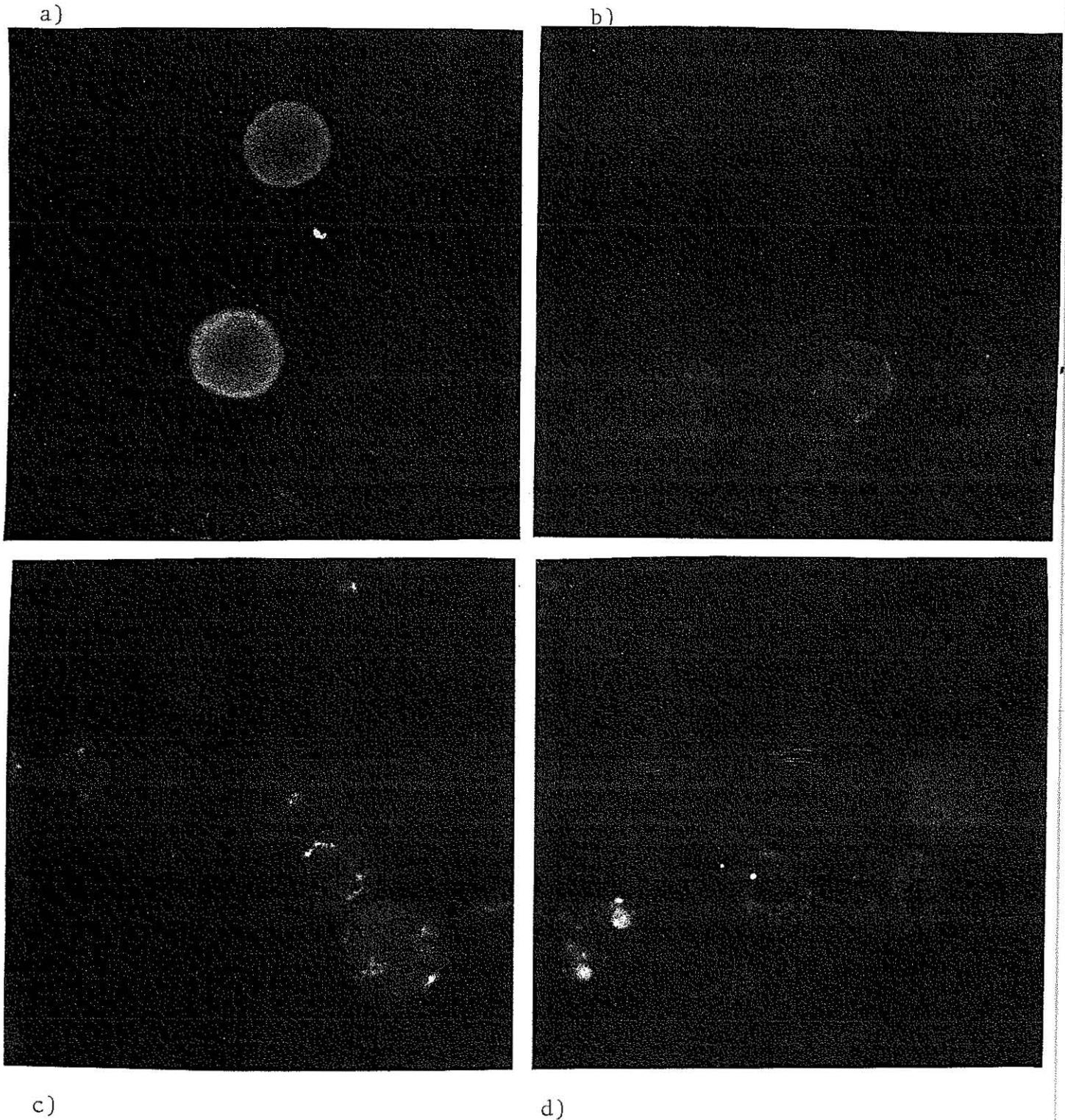
Intensité de fluorescence (+++ > ++ > + > + > -) observée après incubation d'hépatocytes de rats différemment traités en présence de sérum humain contenant des anticorps anti-LKM2 (KUT, JOR ou TAY au 1/25è), puis d'immunoglobulines anti-IgG humaines marquées à la fluorescéine (au 1/100è). Chaque expérience est réalisée indépendamment des autres, sur des hépatocytes de rats différents et observée par 3 lecteurs (les sérums humains témoins testés ne contenant pas d'anticorps anti-LKM2; aucune fluorescence n'apparaît).

Une induction des rats par PB, FEN, TAO ou 3MC préalablement au traitement par l'acide tiénilique n'augmente pas (voire diminue) la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2, d'antigènes de surface hépatocytaire. Par contre, une induction de rats par le clofibrate avant le traitement par l'acide tiénilique conduit à l'apparition d'une fluorescence membranaire intense (+++) dans 4 expériences indépendantes réalisées et avec 3 sérums contenant des anticorps anti-LKM2. Dans le cas d'un traitement des rats par le CRE 4316, une induction préalable par le clofibrate ne conduit pas à l'apparition d'une fluorescence aussi intense que dans le cas d'un traitement par l'acide tiénilique. La figure 41 illustre les résultats des tableaux 16 et 17. Elle montre la fluorescence obtenue avec un sérum humain contenant des anticorps anti-LKM2 (KUT) sur hépatocytes de rats non traités ou traités par CLO, AT ou CLO-AT. Dans le cas d'hépatocytes de rats non traités ou traités par le clofibrate, aucune fluorescence n'apparaît. Celle-ci est faible, mais présente, au niveau de la surface des hépatocytes de rats traités par l'acide tiénilique et elle devient intense en cas de prétraitement par le clofibrate.

Le tableau 18 résume l'ensemble de ces observations. Il apparaît que seul un traitement des rats par le clofibrate puis l'acide tiénilique conduit à la présence, au niveau de la membrane hépatocytaire, de nouveaux antigènes reconnus par les anticorps anti-LKM2. Un traitement des rats par l'acide tiénilique seul n'est pas suffisant pour provoquer de façon nette ce phénomène. Il faut donc créer, au préalable, une perturbation cellulaire, en augmentant par exemple la transformation de l'acide tiénilique en métabolites réactifs. Ce type de



Fig. 41 : Immunofluorescence indirecte obtenue par interaction d'un sérum contenant des anticorps anti-LKM2 (KUT) avec des hépatocytes isolés de rats différemment traités.



Immunofluorescence indirecte d'un sérum contenant des anticorps anti-LKM2 (KUT au 1/25<sup>e</sup>) sur hépatocytes isolés de rats différemment traités par a) CLO-AT ; b) AT ; c) CLO ; d) Témoin.

perturbation semble réalisé de façon spécifique par le clofibrate, dans la mesure où les autres inducteurs testés n'ont conduit à l'apparition d'aucune fluorescence.

Un phénomène analogue a été décrit dans le cas de l'halothane. En effet, une induction préalable des rats par le phéno-barbital avant le traitement par l'halothane augmentait l'apparition de nouveaux antigènes à la surface de leurs hépatocytes (49).

Tableau 18 : Tableau récapitulatif de la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 (en immunofluorescence) d'hépatocytes de rats différemment traités.

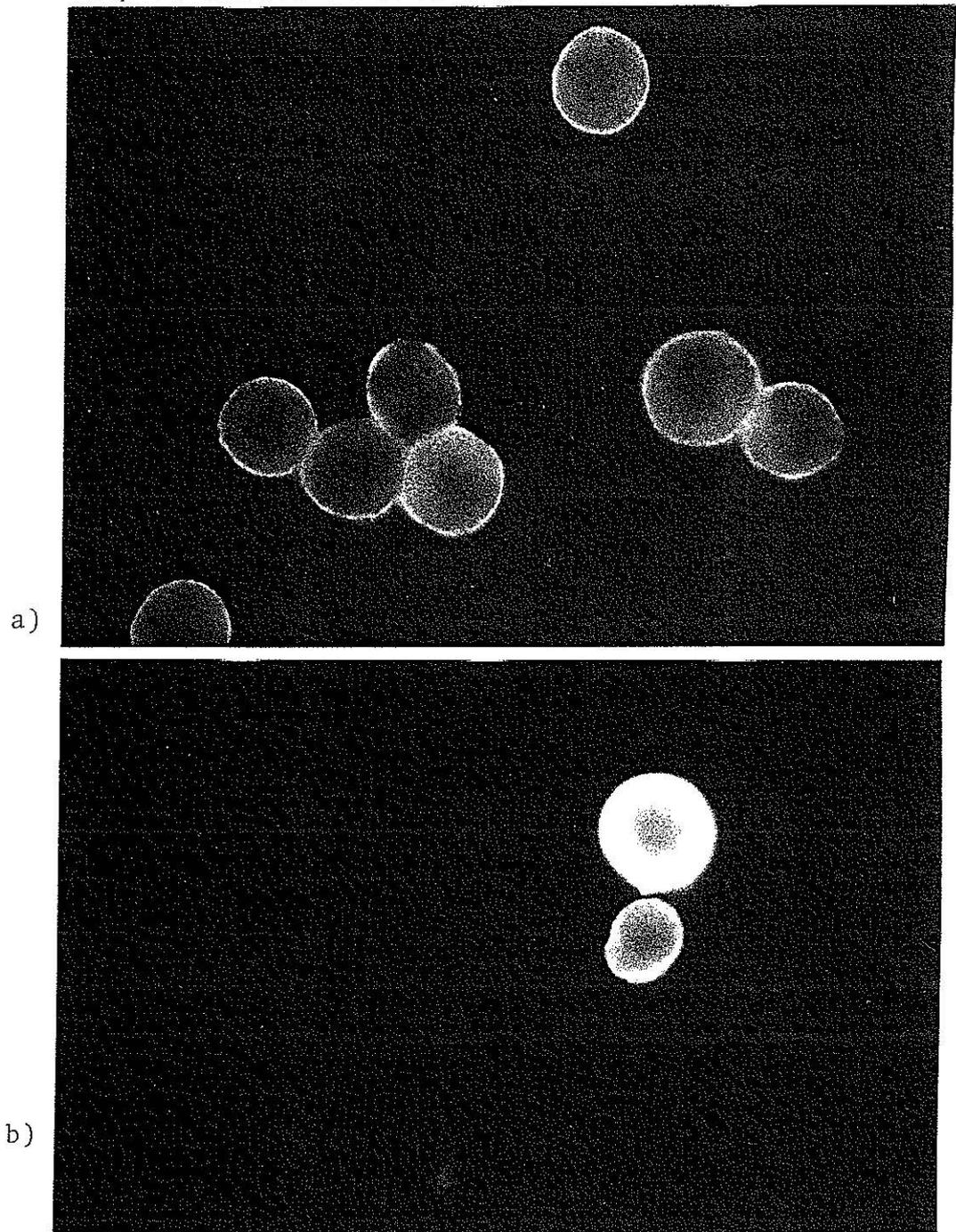
Apparition de fluorescence membranaire	Négative	Faiblement positive	Fortement positive
Traitement des rats	TEM PB CLO FEN TAO 3MC 3MC-AT	AT CRE 4316 CLO-CRE 4316 PB-AT FEN-AT TAO-AT	CLO-AT

IV.1.2. ETUDE DE LA RECONNAISSANCE D'ANTIGENES DE SURFACE  
HEPATOCYTAIRE PAR DIVERS ANTICORPS ANTI-CYTOCHROMES P-450  
HEPATIQUES DE RAT

Les anticorps anti-LKM2 étant dirigés contre un cytochrome P-450 humain et ces anticorps reconnaissant un antigène au niveau de la membrane d'hépatocytes de rats traités par l'acide tiénilique, il était intéressant de rechercher si des anticorps anti-cytochromes P-450 hépatiques de rat révélaient eux-mêmes une protéine de surface hépatocytaire. Deux sérums de lapin ont été testés, contenant, soit des anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A (IIC11), soit des anticorps anti-cytochrome P-450-ISF-G (IA2) en ce qui concerne leur capacité à reconnaître des protéines à la surface d'hépatocytes de rats témoins ou traités par CLO, AT ou CLO-AT. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 19.

Tout d'abord, il faut remarquer que des sérums de lapin non immuns ne conduisent à aucune apparition de fluorescence. Par contre, les anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A (IIC11) révèlent une protéine présente sur la membrane d'hépatocytes de rats témoins ou traités par CLO ou AT avec une intensité proche (+ à ++). Par contre, un traitement des rats par CLO-AT augmente de façon nette l'intensité de la fluorescence (+++) observée avec ces anticorps, ce qu'illustre la figure 42 où les anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A (IIC11) conduisent à l'apparition d'une fluorescence importante au niveau de la membrane d'hépatocytes de rats témoins mais plus intense dans le cas de rats traités par le clofibrate puis par l'acide tiénilique. Ce résultat suggère l'existence de cytochrome P-450 (ou de protéines présentant une réaction croisée) au niveau de la membrane plasmique des hépatocytes de rats non traités. Cette observation a également été faite par SATOH et coll. (84). Ces auteurs ont montré qu'un traitement des rats par le phéno-barbital conduit à la présence du cytochrome P-450-PB-B (IIB1) à la surface de leurs hépatocytes.

Fig. 42 : Immunofluorescence indirecte obtenue par interaction d'anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A avec des hépatocytes isolés de rats témoins ou traités.



Immunofluorescence indirecte d'un sérum de lapin contenant des anticorps anti-cytochromes P-450-UT-A sur hépatocytes isolés de rats témoins (a) ou traités par CLO-AT (b).

Tableau 19 : Intensité de fluorescence observée lors de la reconnaissance d'hépatocytes de rats par des anticorps anti-cytochromes P-450 de rat.

Traitement des rats  N°expér.	A N T I C O R P S					
	anti-UT-A (IIC11)			anti-ISF-G (IA2)		
	L.1	L.2	L.3	L.1	L.2	L.3
TEM 1	++	+	++	-	<u>+</u>	-
2	+	+	+	-	<u>+</u>	-
3	+	++	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>
4	++	++	++	+	<u>+</u>	<u>+</u>
CLO 1	+	<u>+</u>	<u>+</u>	+	<u>+</u>	-
2	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	+	<u>+</u>
3	+	+	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>
4	<u>+</u>	<u>+</u>	+	<u>+</u>	<u>+</u>	+
AT 1	++	+	++	-	<u>+</u>	-
2	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	-
3	++	+	+	<u>+</u>	-	-
4	+	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	+
CLO-AT 1	+++	+++	+++	-	<u>+</u>	<u>+</u>
2	+++	+++	++	+	<u>+</u>	<u>+</u>
3	++	++	+	<u>+</u>	-	<u>+</u>
4	+++	++	++	<u>+</u>	<u>+</u>	+

L = lecteur

Intensité de fluorescence (+++ > ++ > + > + > -) observée après incubation d'hépatocytes de rats différemment traités en présence de sérum de lapin contenant des anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A ou anti-cytochrome P-450-ISF-G (au 1/25è), puis d'immunoglobulines anti-IgG de lapin marquées à la fluorescéine (au 1/200è). Chaque expérience est réalisée indépendamment des autres sur des hépatocytes de rats différents et observée par 3 lecteurs .

Les sérums de lapin non immuns testés ne conduisent à aucune apparition de fluorescence.

Afin de vérifier si les observations effectuées avec les anticorps anti-UT-A(IIC11) étaient spécifiques, des expériences analogues ont été réalisées avec des anticorps anti-ISF-G (IA2). Comme le montre le tableau 19, aucune fluorescence n'apparaît avec ces anticorps, que ce soit avec des hépatocytes de rats non traités ou traités par CLO, AT ou CLO-AT.

Ces résultats, résumés dans le tableau 20 suggèrent que le cytochrome P-450-UT-A (IIC11) est présent au niveau de la membrane d'hépatocytes de rats non traités. La présence de cytochromes P-450 dans la membrane plasmique a été une question très controversée pendant de nombreuses années. Récemment, divers auteurs l'ont démontrée par des techniques indirectes (85, 86).

Tableau 20 : Tableau récapitulatif de la reconnaissance en immunofluorescence indirecte par des anticorps anti-cytochromes P-450 d'hépatocytes isolés de rats différemment traités.

Hépatocytes Sérums	TEM	CLO	AT	CLO-AT
anti-UT-A (IIC11)	++	+	+	+++
anti-ISF-G (IA2)	-	-	-	-

Dans cette étude, l'homologie entre anticorps humains anti-LKM2 et anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A est confirmée par le fait qu'ils révèlent tous deux de façon intense des hépatocytes de rats traités par CLO-AT. Cependant, ces anticorps n'ont pas un comportement complètement identique car les anticorps anti-LKM2 ne reconnaissent pas la membrane d'hépatocytes de rats témoins. Plusieurs hypothèses peuvent être émises.

La protéine présente à la surface d'hépatocytes de rats non traités est en trop faible quantité pour être reconnue par les anticorps anti-LKM2. Un problème de seuil de détection pourrait être à l'origine de cette non-reconnaissance. Les anticorps anti-LKM2, comme il a été vu (p. 72) ne révèlent le cytochrome P-450-UT-A que dans les microsomes où il est présent à un taux suffisant, pas dans ceux où ce taux est fortement diminué après une induction.

Une autre hypothèse serait que les cytochromes P-450 présents normalement au niveau de la membrane plasmique soient légèrement différents des cytochromes P-450 du réticulum endoplasmique (87). Une différence portant sur les épitopes reconnus par les anticorps anti-LKM2 pourrait conduire à une absence de reconnaissance. Ces anticorps ne révéleraient que des cytochromes P-450 du réticulum endoplasmique ayant "migré" vers la membrane sous l'influence du traitement des rats par CLO-AT.

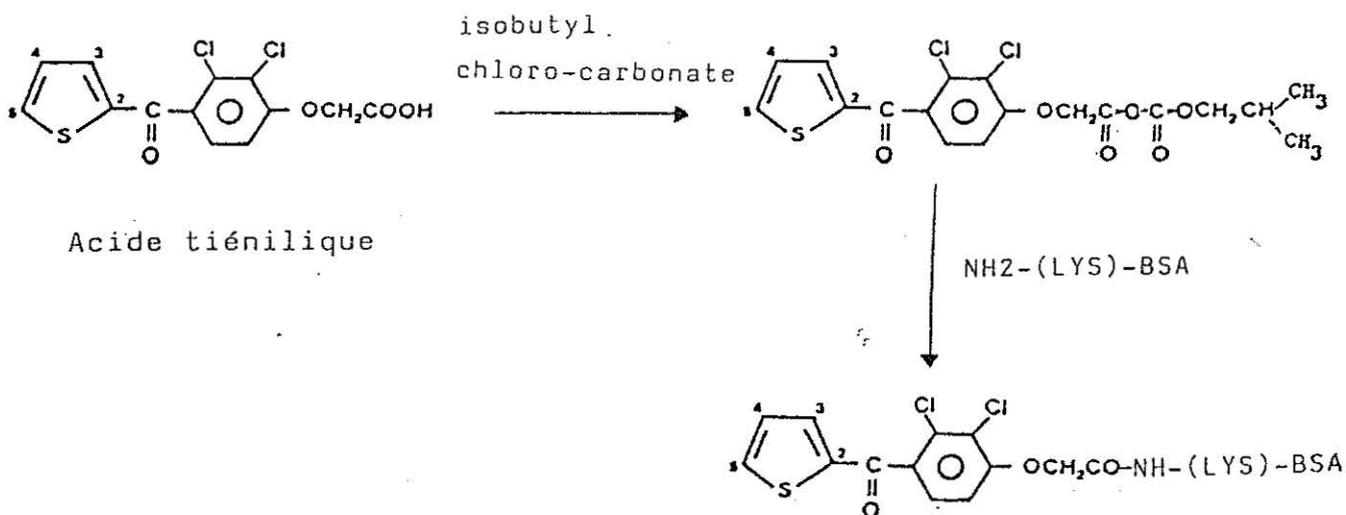
## IV.2. ÉTUDE DE L'APPARITION D'UNE PROTÉINE HAPTÉNISÉE À LA SURFACE D'HÉPATOCTES DE RATS TRAITÉS PAR L'ACIDE TIÉNILIQUE

La seconde approche suggérée par les études de POHL et coll. sur le mécanisme d'hépatotoxicité de l'halothane, consiste à rechercher la présence d'une protéine porteuse d'un haptène dérivé de l'acide tiénilique à la surface d'hépatocytes de rats traités par l'acide tiénilique. Pour cela, il a fallu tout d'abord obtenir des anticorps anti-acide tiénilique avant de les tester, en immunofluorescence, sur hépatocytes de rats traités par l'acide tiénilique.

### IV.2.1. OBTENTION D'ANTICORPS ANTI-ACIDE TIÉNILIQUE

L'acide tiénilique a été couplé à une protéine porteuse (sérum albumine bovine (BSA) ou caséine) par la fonction acide comme il est décrit figure 43.

Fig. 43 : Couplage de l'acide tiénilique à une protéine porteuse.



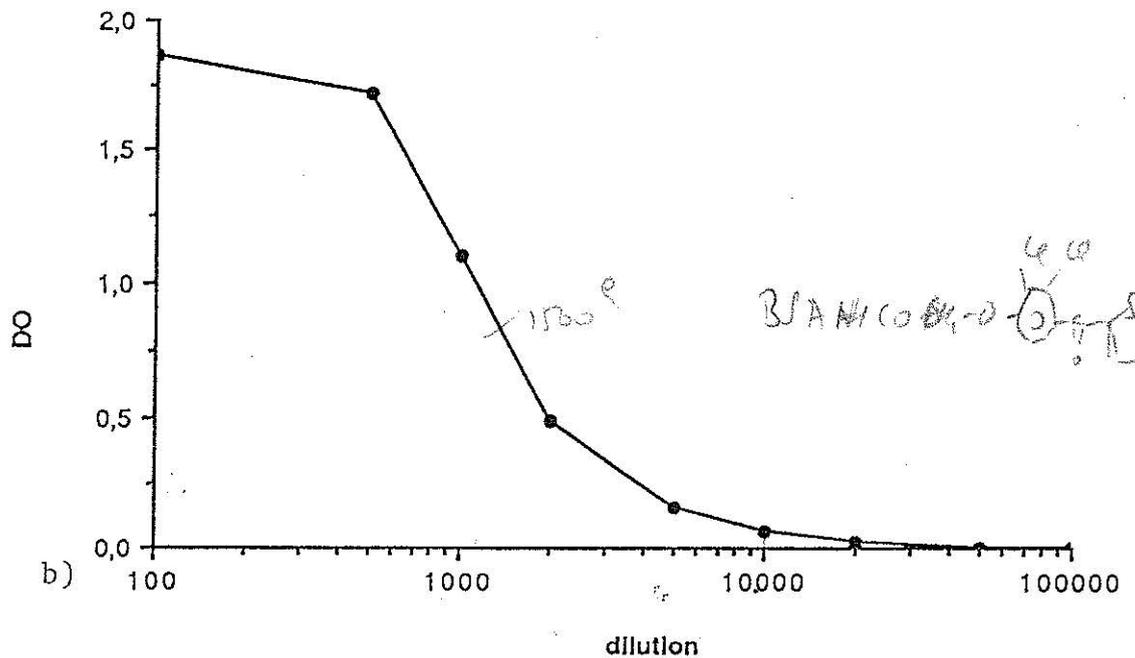
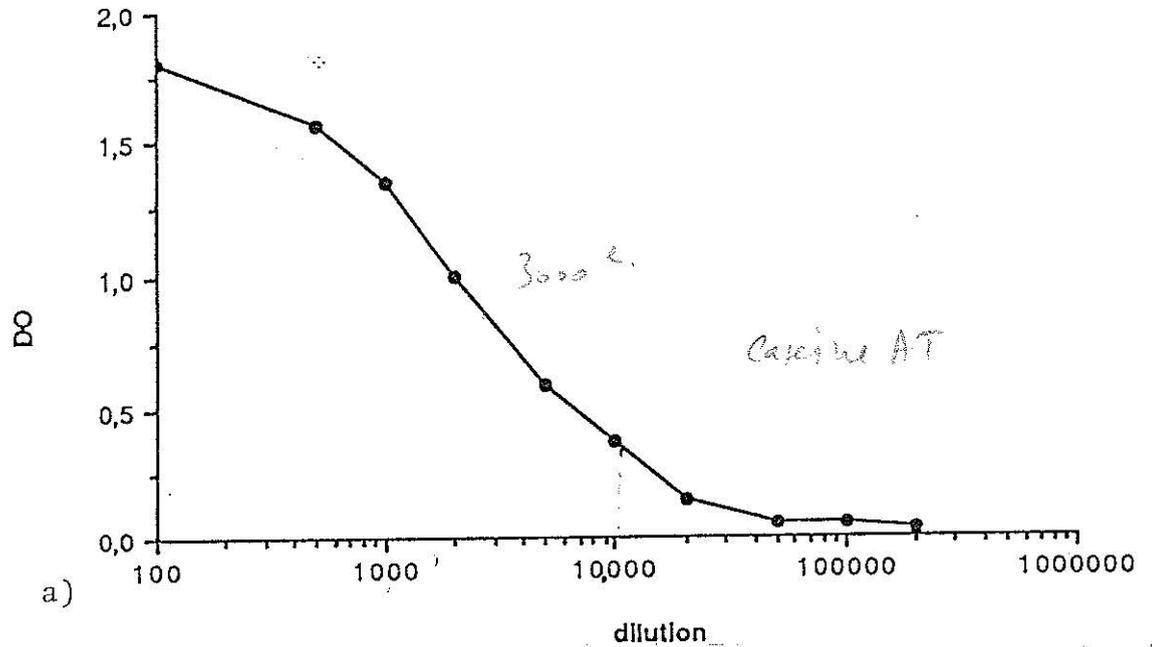
Cette première approche, pour la préparation d'anticorps anti-acide tiénilique (couplage de l'acide tiénilique à une protéine

par sa fonction acide) n'est peut-être pas la meilleure. En effet, le noyau thiophène est vraisemblablement impliqué dans la formation de liaisons covalentes aux protéines hépatiques après activation métabolique de l'acide tiénilique (88). Le couplage de l'acide tiénilique par le noyau thiophène à une protéine posait des problèmes de synthèse chimique. Aussi, dans un premier temps, il a été choisi de réaliser ce couplage (acide tiénilique-protéine) par la fonction acide.

Quatre lapins ont été immunisés soit par l'acide tiénilique couplé à la BSA (BSA-AT), soit par l'acide tiénilique couplé à la caséine (CAS-AT). Deux d'entre eux ont bien répondu en produisant des anticorps anti-acide tiénilique comme il est montré dans la figure 44. En effet, la présence d'anticorps anti-acide tiénilique dans le sérum de ces lapins a été testée en ELISA. Afin de ne détecter que les anticorps anti-AT (et non les anticorps anti-protéine porteuse), le sérum de lapin immunisé par BSA-AT a été testé en ce qui concerne sa capacité à se fixer sur CAS-AT (déposé sur les plaques d'ELISA). Le sérum du lapin immunisé par CAS-AT a été testé pour sa capacité à reconnaître BSA-AT. Si des anticorps anti-AT ont été produits par les lapins, ces anticorps peuvent se fixer sur BSA-AT ou CAS-AT. Cette fixation est mesurée par adsorption à 490 nm après addition d'immunoglobulines anti-Ig de lapin marquées à la peroxydase et du substrat de cette enzyme. La figure 44 montre les courbes de titration en anticorps anti-AT obtenues à partir de différentes dilutions ( $10^2$  à  $10^6$ ) des sérums de ces lapins. Les titres en anticorps anti-AT de ces sérums sont supérieurs au 1/10.000.

Afin de vérifier que la mesure qui vient d'être effectuée porte bien sur les anticorps anti-AT, la même expérience est répétée mais en préincubant cette fois-ci les sérums à tester en présence d'acide tiénilique ou de produits de structure chimique proche décrits figure 45. Cette préincubation des sérums

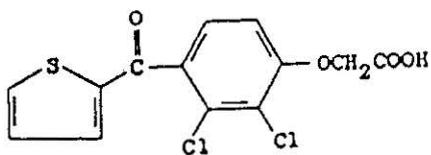
Fig. 44 : Test en ELISA de la présence d'anticorps anti-acide tiénilique dans le sérum de lapins immunisés par BSA-AT ou Caséine-AT.



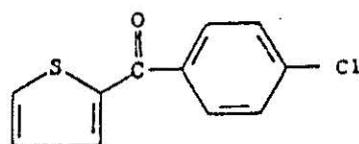
La présence d'anticorps anti-acide tiénilique dans le sérum de lapins ANT et THI immunisés respectivement par BSA-AT ou Caséine-AT est testée en ELISA en utilisant 100  $\mu$ l par puits d'une solution de Caséine-AT (a) ou BSA-AT (b) à 0,5  $\mu$ g/ml. Les sérums ANT et THI sont dilués de  $10^2$  à  $10^6$ .

(50  $\mu$ g/puits)

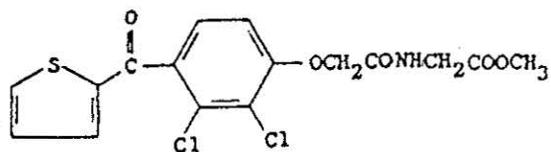
Fig. 45 : Structure des produits utilisés lors de l'inhibition de la reconnaissance en test ELISA de sérums de lapins immunisés par BSA-AT ou Caséine-AT.



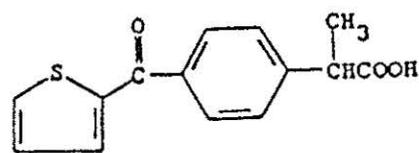
Acide thiénylique(AT)



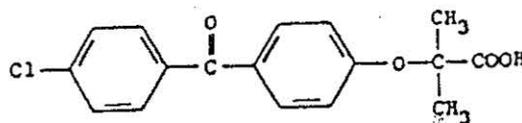
Para chlorobenzoyl thiophène(Parach.THIO)



Acide thiénylique-Glycine(AT-GLY)

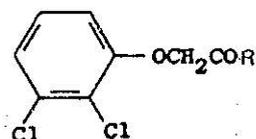


Suprofen



Acide fénofibrique(Ac.FEN)

permet aux anticorps anti-AT présents de se fixer sur l'AT ou sur les produits analogues. Par conséquent, cela peut conduire à une inhibition de la fixation sur BSA-AT ou CAS-AT déposés sur les plaques d'ELISA. Pour une dilution de sérum donnée et des quantités croissantes de produit (AT ou autres), une diminution de la fixation de ces sérums sur les plaques d'ELISA est observée. La figure 46 montre ces courbes d'inhibition. La fixation des anticorps anti-AT, présents dans le sérum des lapins, sur BSA-AT ou CAS-AT (déposés sur les plaques d'ELISA) est inhibée de façon nette (85 % environ) par AT, CAS-AT, BSA-AT ou AT-GLY et ce, pour les deux sérums. Par contre, une inhibition plus faible est observée dans le cas de l'acide fénofibrique (Ac-FEN), du parachlorobenzoyl thiophène (Parach. THIO) et du Suprofen. Cela est compréhensible car les structures chimiques de ces produits sont plus éloignées de celle de l'acide tiénilique. Ces anticorps anti-AT semblent donc dirigés plus particulièrement contre le motif :



plutôt que contre le noyau thiophène. Cela est en accord avec le mode de couplage (par la fonction acide) réalisé.

#### IV.2.2. TEST DES ANTICORPS ANTI-ACIDE TIENILIQUE SUR HEPATOCYTES DE RATS TRAITES PAR L'ACIDE TIENILIQUE

Ces sérums de lapin, contenant des anticorps anti-acide tiénilique, ont été testés en ce qui concerne leur capacité à reconnaître une protéine, hapténisée par un dérivé de l'acide tiénilique, présente à la surface d'hépatocytes de rats traités par ce produit. Le test en immunofluorescence de ces sérums de lapin sur hépatocytes isolés de rats traités par l'acide tiénilique seul ou après induction par différents produits (PB, CLO, FEN, TAO, 3MC) n'a donné lieu à l'apparition d'aucune fluorescence.



Deux explications peuvent être avancées, soit les sérums obtenus chez les lapins n'ont pas un titre suffisant en anticorps anti-AT pour détecter des protéines hapténisées par l'AT à la surface des hépatocytes (problème de seuil de détection), soit les anticorps produits ne reconnaissent pas la protéine hapténisée. Ceci serait compréhensible si l'acide tiénilique (ou un métabolite dérivé) est fixé à la protéine par le noyau thiophène. Les anticorps produits chez le lapin ne reconnaissant pas ce motif chimique, ils ne peuvent détecter la présence de protéines hapténisées.

#### IV.3. CONCLUSION

Dans ce chapitre, il a été développé un modèle d'étude chez l'animal permettant d'explorer l'étape 4 du mécanisme d'apparition des anticorps anti-LKM2 qui est proposé dans la figure 12 (p.35).

L'hypothèse de la présence d'un néo-antigène au niveau de la membrane hépatocytaire était envisagée. Il a été montré qu'un traitement des rats par l'acide tiénilique pouvait faire apparaître sur la membrane des hépatocytes de nouveaux antigènes reconnus par les anticorps anti-LKM2. Ce phénomène est fortement amplifié par une induction des rats par le clofibrate, préalablement au traitement par l'acide tiénilique. Cette induction, en augmentant l'activation métabolique de l'acide tiénilique, et donc la formation de métabolites réactifs, et en induisant la prolifération de peroxysomes (89), doit créer une perturbation cellulaire importante et entraîner l'apparition de néo-antigènes à la surface des hépatocytes.

L'hypothèse la plus vraisemblable, vérifiée dans le cas de l'halothane, serait que les auto-anticorps soient dirigés

contre une protéine hapténisée par le médicament (ou un de ses dérivés) responsable de l'hépatite.

Dans cette étude, des informations ont été apportées concernant la première partie de cette hypothèse, à savoir la présence d'une protéine membranaire reconnue par les anticorps anti-LKM2. Par contre, avec les anticorps anti-AT disponibles, il n'a pas été possible de détecter la présence d'un haptène dérivé de l'acide tiénilique au niveau de la membrane d'hépatocytes de rats traités par l'acide tiénilique.

A partir du schéma proposé figure 12, plusieurs étapes ont pu être montrées :

- activation de l'acide tiénilique en métabolites réactifs par les protéines microsomales hépatiques,
- fixation covalente de ces métabolites réactifs sur les protéines hépatiques,
- apparition à la surface d'hépatocytes de rats induits par le clofibrate puis traités par l'acide tiénilique de protéines reconnues par les anticorps anti-LKM2.

Il reste à expliquer cette apparition de néo-antigènes à la surface des hépatocytes. En effet, les cytochromes P-450 étant situés au niveau du réticulum endoplasmique, par quel mécanisme se retrouvent-ils au niveau de la membrane plasmique ?

Il a été montré que, contrairement aux autres protéines cellulaires, les cytochromes P-450 ne migrent pas par l'intermédiaire de l'appareil de Golgi (90). Il faut donc envisager un autre mécanisme de migration. Une hypothèse a été émise selon laquelle après alkylation du cytochrome P-450, une coupure se produit au niveau de l'extrémité N-terminale de cette protéine. Les cytochromes P-450 étant situés à la face cytoplasmique

du réticulum endoplasmique, seule leur extrémité N-terminale est insérée dans la bicouche lipidique (91, 92). Une coupure à ce niveau, ou une modification des lipides membranaires (par le clofibrate), libèrerait la protéine dans le cytoplasme cellulaire. Le flux cytoplasmique dû aux microtubules et microfilaments permettrait à cette protéine d'atteindre la membrane plasmique où elle serait intégrée. ?

L'autre hypothèse envisagée est basée sur la présence de cytochromes P-450 au niveau de la membrane plasmique. La formation de métabolites réactifs se ferait à ce niveau et conduirait à l'expression directe d'un néo-antigène à la surface de l'hépatocyte (84).

## CHAPITRE V

Détermination des protéines  
hépatiques reconnues par les anticorps  
anti-mitochondries (anti-M6)  
apparaissant dans le sérum de patients  
lors d'une hépatite à l'iproniazide

## OBJECTIFS

L'iproniazide (Marsilid\*), antidépresseur, a été retiré du marché aux Etats-Unis, en raison de l'apparition fréquente d'hépatites (1 % des patients traités) qu'il provoquait (93). Des anticorps anti-mitochondries ont été détectés dans le sérum des malades présentant une hépatite après administration d'iproniazide (94). Ces anticorps anti-tissus, donnant un profil de reconnaissance particulier en immunofluorescence sur coupes d'organes de rat, ont été dénommés anticorps anti-M6 afin de les différencier des anticorps anti-mitochondries détectés dans d'autres désordres hépatiques (42).

L'hypothèse énoncée dans l'introduction (figure 12, p. 35), selon laquelle un médicament transformé en métabolite réactif pourrait se fixer sur la protéine l'ayant généré et, par conséquent la transformer en cible pour le système immunitaire, est applicable au cas de l'iproniazide. Ce médicament étant un inhibiteur irréversible des monoamine oxydases (MAO) (95), ces enzymes seraient susceptibles de jouer le rôle de protéine cible.

### V.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES MONOAMINE OXYDASES

Ces monoamine oxydases, enzymes à flavine (FAD), présentes dans la plupart des tissus de Mammifères, ont pour rôle la désamination oxydative des amines et plus particulièrement, la dégradation des neurotransmetteurs. Ces enzymes, la MAO A et la MAO B, sont localisées au niveau de la membrane externe des mitochondries. Les MAO A et B, bien que proches par leur séquence protéique (70 % d'homologie) (96) diffèrent entre elles par la nature de leurs substrats et de leurs inhibiteurs spécifiques ainsi que par leur distribution tissulaire et leur poids moléculaire, comme il est indiqué dans le tableau 21 (97, 98).

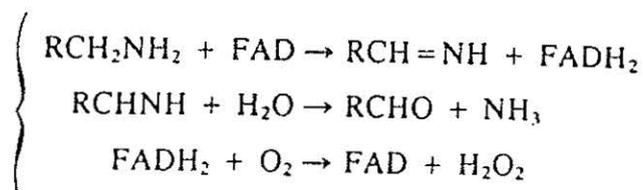
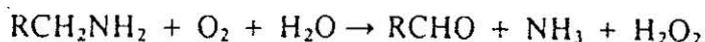
Tableau 21 : Quelques propriétés des monoamine oxydases A et B (d'après 97, 98)

Caractérisation	MAO A	MAO A et B	MAO B
Cofacteur	FAD	-	FAD
Substrat	5-hydroxytryptamine	Tyramine	Phényléthylamine Benzylamine
Inhibiteurs irréversibles	Clorgyline	Pargyline Iproniazide	Déprényl
Localisation	Membrane externe des mitochondries		
	surface interne		surface externe
Distribution tissulaire	Placenta	Foie Cerveau	Plaquettes Leucocytes
Poids moléculaire d'une sous-unité (structure dimérique)	64 à 67 kd	-	60 à 64 kd

La MAO A oxyde spécifiquement la 5-hydroxytryptamine et est sélectivement inhibée par la clorgyline. La MAO B oxyde la phényléthylamine et la benzylamine et est inhibée par le déprényl de façon spécifique. Ces deux enzymes ont cependant des substrats communs dont la tyramine, et peuvent être inhibées toutes deux par des concentrations adéquates de pargyline, ou d'iproniazide. Ces deux enzymes sont présentes, en proportion variable, dans de nombreux tissus, mais seule la MAO A est retrouvée dans le placenta.

La réaction globale d'oxydation des substrats par les monoamine oxydases est décrite figure 47 et peut être décomposée en 3 réactions (99)

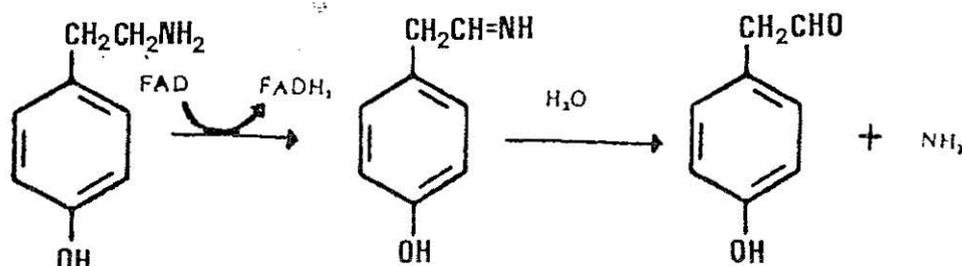
Fig. 47 : Réaction d'oxydation de substrats par les monoamine oxydases (d'après 99)



Les monoamine oxydases sont composées de deux sous-unités identiques dans le cas de la MAO B et probablement différentes dans le cas de la MAO A (100), dont une fixe la FAD. Ce cofacteur est essentiel pour la formation d'imine à partir de l'amine primaire, l'imine étant ensuite hydrolysée en aldéhyde. La figure 48 montre l'oxydation de la tyramine par les monoamine oxydases.

La FAD intervient également dans le mécanisme d'inhibition irréversible des MAO par différents composés. Certains inhibiteurs irréversibles se fixent de façon covalente à la molécule de FAD, leur réaction sur les MAO étant alors stoechiométrique (1 mole d'inhibiteur/mole de MAO). La structure de

Fig. 48 : Oxydation de la tyramine par les monoamine oxydases



l'adduit formé dépend de celle de l'inhibiteur. L'oxydation des inhibiteurs de la classe des propargylamines (pargyline, clorgyline, déprényl) conduit à la formation d'un adduit par réaction avec l'azote en position 5 de la flavine réduite. Les hydrazines appartenant à la deuxième classe d'inhibiteurs forment un adduit en position 4a de la flavine mais peuvent également réagir sur une cystéine du site actif. Les structures de ces deux types d'adduits sur la FAD sont représentées figure 49 (99) et celles de certains de ces inhibiteurs irréversibles figure 50.

## V.2. L'ISOPRONIAZIDE EN TANT QU'INHIBITEUR IRRÉVERSIBLE DES MONOAMINE OXYDASES

Le métabolisme de l'iproniazide par les cytochromes P-450 hépatiques est décrit dans la figure 51 (101).

L'iproniazide est métabolisé en acide isonicotinique et en isopropylhydrazine. L'isopropylhydrazine est elle-même activée par les cytochromes P-450 hépatiques en métabolites réactifs (cation ou radical isopropyls) qui peuvent conduire au propane ou alkyler les protéines hépatiques (101). D'autre part, le groupe de UNDEFRIED a démontré la fixation irréversible de la partie isopropylhydrazine sur de la MAO de cochon d'Inde partiellement purifiée (95) bien que le mode de fixation exact ne soit pas connu.

Fig. 49 : Structure proposée pour les adduits formés sur la FAD par réaction de certains inhibiteurs irréversibles des monoamine oxydases (d'après 99)

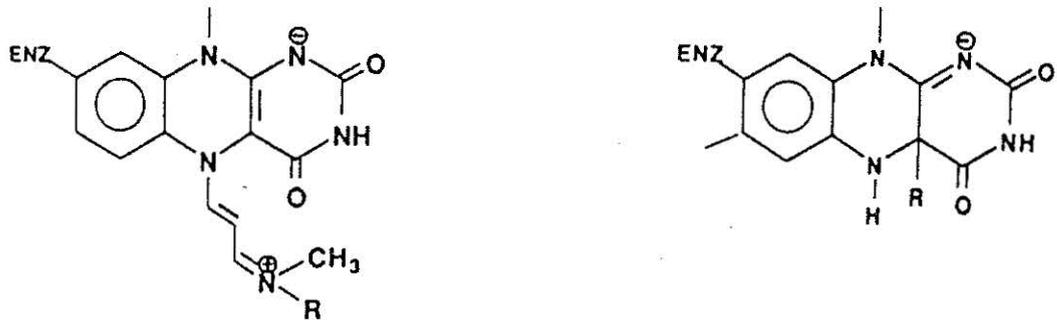


Fig. 50 : Structure de certains inhibiteurs irréversibles des monoamine oxydases.

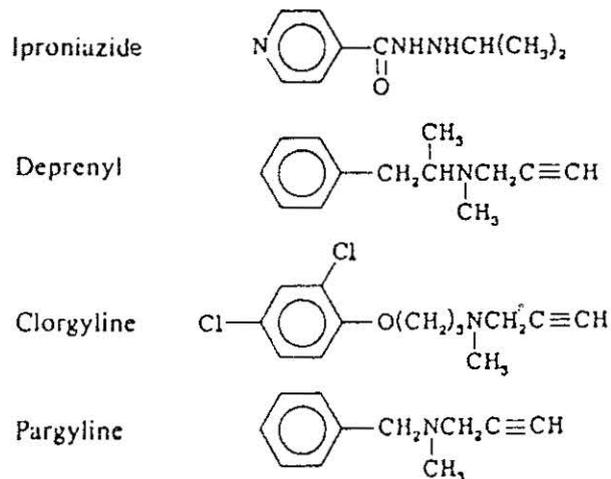
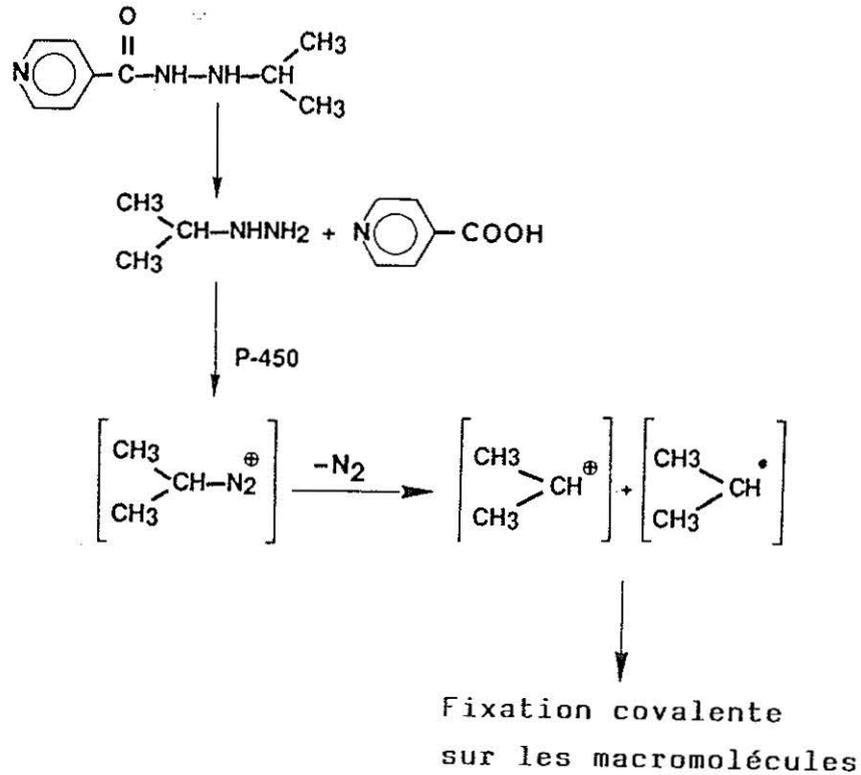


Fig. 51 : Métabolisme de l'iproniazide (d'après 100).



Une activation oxydante analogue de l'isopropylhydrazine est envisageable par les MAO d'autant plus que ces enzymes sont connues pour oxyder certains xénobiotiques (104). L'oxydation des hydrazines (donc de l'isopropylhydrazine) par les MAO produit des dérivés qui peuvent alkyler la molécule de FAD ou une cystéine du site actif, et donc inhiber ces enzymes.

D'après le mécanisme général d'apparition des auto-anticorps proposé dans la figure 12 (p. 35), il peut être envisagé que les anticorps anti-M6 soient dirigés contre les MAO, éventuellement modifiées par un métabolite dérivé de l'iproniazide. Les études suivantes ont été réalisées dans le but de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

### V.3. IMMUNOPRÉCIPITATION DES MONOAMINE OXYDASES DE FOIE PAR LES ANTICORPS ANTI-M6

La technique utilisée est basée sur le marquage spécifique des MAO par la pargyline tritiée, inhibiteur et alkylant des MAO A et B. La pargyline se fixe de façon covalente sur la molécule de FAD liée à une des sous-unités des MAO, la stoechiométrie de la réaction étant de 1 (figures 49 et 50).

Ce marquage des MAO est réalisé, d'après une technique décrite par BANCELLS et coll. (62), en incubant 325 µg de protéines mitochondriales pendant 60 min à 37°C en présence de 0,9 µM de pargyline tritiée dans un volume final de 50 µl. Cela permet de fixer environ 10 à 20 pmoles de pargyline/mg protéines mitochondriales de foie humain.

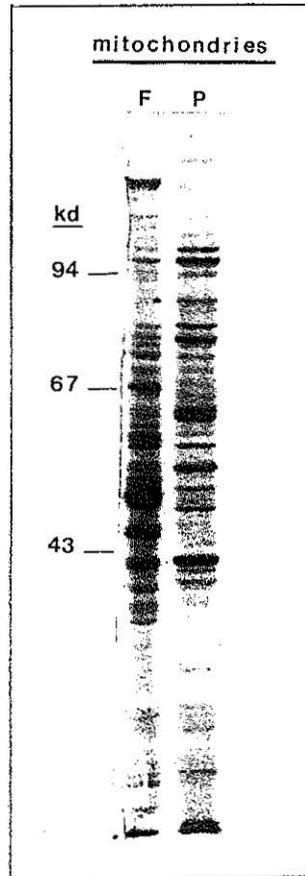
Une coloration au bleu de Coomassie de gels d'électrophorèse après séparation des protéines mitochondriales ne suffit pas à distinguer les MAO (figure 52), ces enzymes ne représentant qu'une faible proportion des protéines totales (10 à 20 pmoles de MAO/mg protéines mitochondriales)(102)

Par contre, une électrophorèse des protéines mitochondriales marquées à la pargyline tritiée, suivie d'une fluorographie (figure 53) permet d'observer deux bandes radioactives dans les mitochondries de foie humain, la MAO A (environ 64 kd) et, en plus faible proportion, la MAO B (60 kd) et une bande dans les mitochondries de placenta humain où seule la MAO A est présente.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par GOMEZ et coll. (103) dans des conditions analogues.

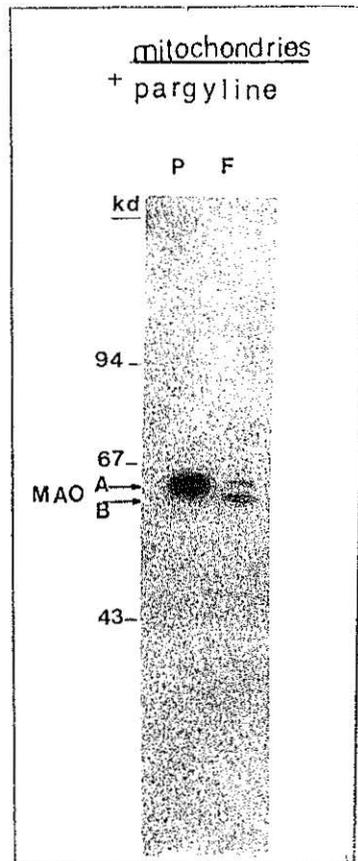
La fixation spécifique de la pargyline sur les MAO permet de tester la capacité des anticorps anti-M6 à immunoprécipiter ces enzymes, donc la fraction mitochondriale radioactive.

Fig. 52 : Profil électrophorétique de protéines mitochondriales de foie et de placenta humains.



Electrophorèse sur gel SDS / polyacrylamide (9 %) de protéines mitochondriales (16 µg) de foie (F) ou de placenta (P) humains et coloration au bleu de Coomassie.

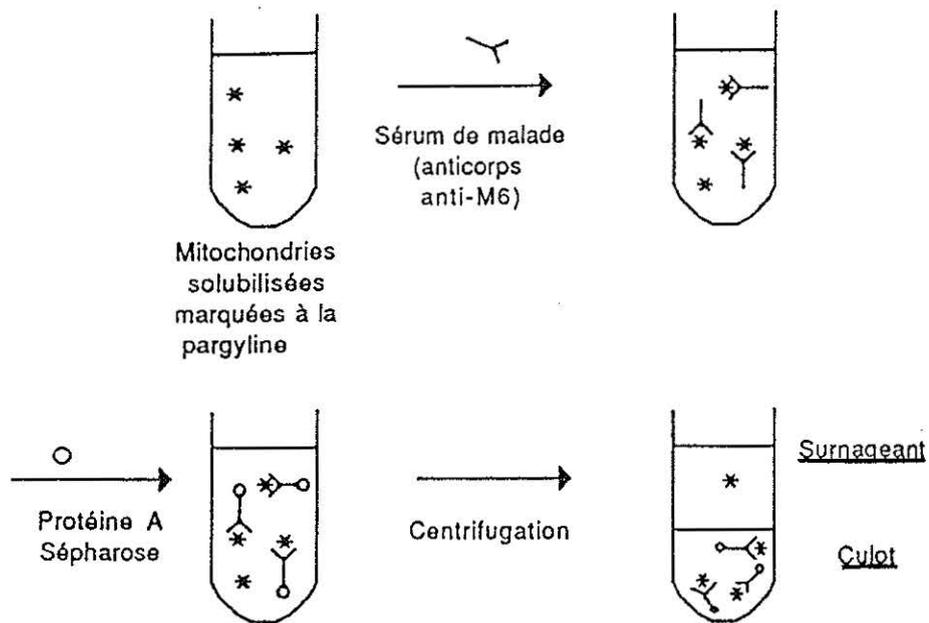
Fig. 53 : Fluorographie de protéines mitochondriales marquées à la pargyline tritiée.



Fluorographie après séparation sur gel SDS/polyacrylamide (9 %) de 40 µg de protéines mitochondriales de foie (F) ou de placenta (P) humains marquées à la pargyline tritiée (incubation de 325 µg de protéines mitochondriales en présence de 0,9 µM de pargyline tritiée dans un volume final de 50 µl, prélèvement, solubilisation et dépôt d'un aliquot).

Cette technique d'immunoprécipitation dont le principe est décrit figure 54 a été utilisée par différents auteurs travaillant sur les MAO dont le groupe de MAYER (105).

Fig. 54 : Principe de l'immunoprécipitation de protéines mitochondriales (MAO) par les anticorps anti-M6



Les protéines mitochondriales après marquage à la pargyline tritiée, comme indiqué précédemment, sont lavées par du tampon phosphate afin d'éliminer la pargyline non fixée puis solubilisées par des détergents (mélange de CHAPS 1 % et de Triton 0,4 %). Une centrifugation permet d'éliminer les mitochondries non solubilisées (perte de 10 % environ de protéines). Le surnageant obtenu, contenant une solution homogène de mitochondries, est incubé dans un volume final de 100 µl en présence de sérum humain témoin ou contenant des anticorps anti-M6. L'addition de 50 µl d'une suspension de protéine A Sépharose permet de précipiter les immunoglobulines ayant elles-mêmes, éventuellement, fixé des protéines.

En cas de reconnaissance des monoamine oxydases par les anticorps anti-M6, le complexe précipité contient la fraction radioactive. Dans le cas inverse de non-reconnaissance des protéines marquées à la pargyline par les anticorps anti-M6, la fraction radioactive reste dans le surnageant.

Afin d'examiner cette éventuelle reconnaissance, la radioactivité présente dans le culot précipité est comptée (après lavage) ainsi que celle présente dans le surnageant (après précipitation des protéines sur filtres de verre).

#### V.3.1. MAO A ET B

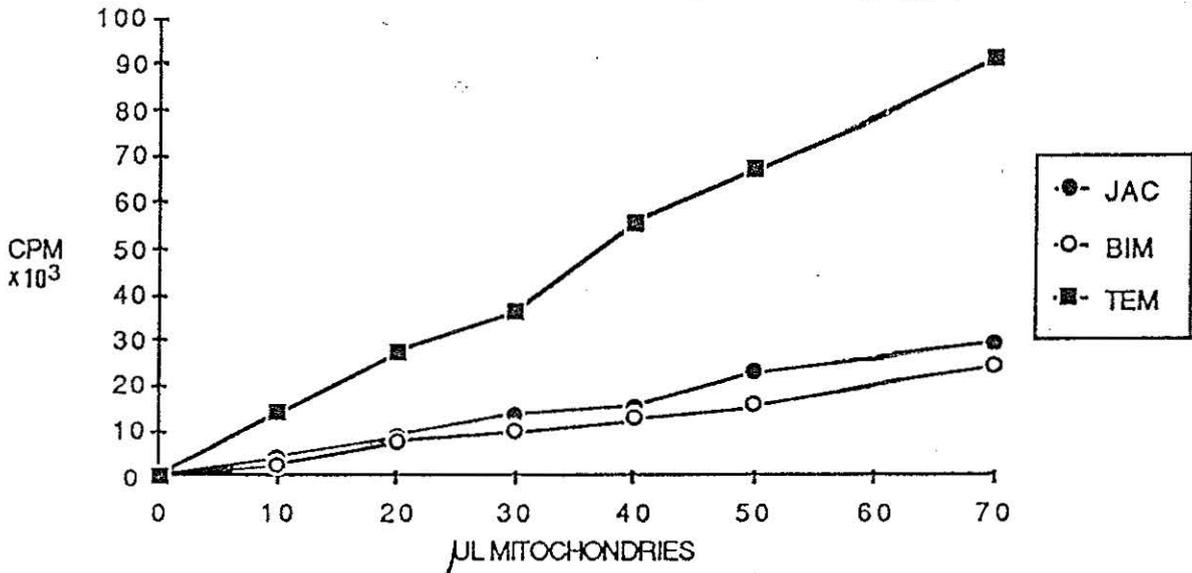
Dans un premier temps, nous avons étudié la capacité des anticorps anti-M6 (JAC, BIM) à reconnaître les MAO présentes dans les mitochondries de foie humain, sans chercher à distinguer les formes A et B.

Les expériences ont été réalisées par la technique précédemment décrite en utilisant des quantités variables de protéines mitochondriales de foie humain (10 à 70  $\mu$ l de la solution mitochondriale solubilisée à 6  $\mu$ g/ $\mu$ l de protéines) et une quantité constante de sérum humain (1  $\mu$ l par incubation). La figure 55 montre le résultat d'une expérience (deux autres expériences effectuées indépendamment ont donné des résultats similaires). Les courbes obtenues indiquent que les deux sérums humains, contenant des anticorps anti-M6 (BIM, JAC) se comportent de façon analogue (courbes parallèles) et à l'inverse du sérum témoin (TEM). Pour une quantité de protéines mitochondriales donnée, la radioactivité initiale est retrouvée principalement dans le culot dans le cas des sérums JAC et BIM et dans le surnageant dans le cas du sérum TEM.

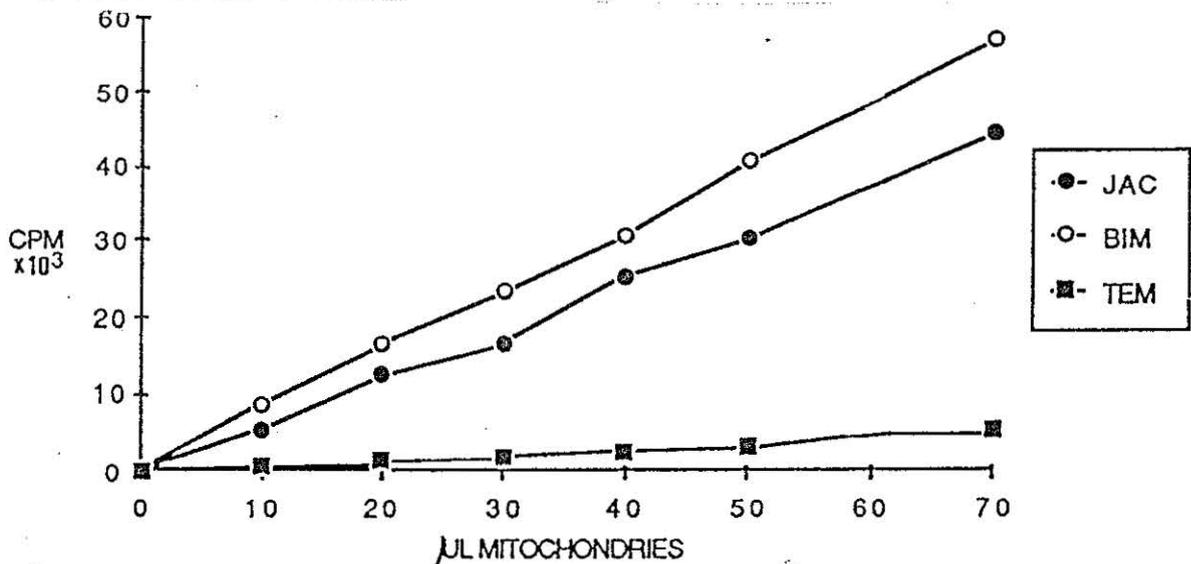
La linéarité des courbes montre que les sérums et la protéine A Sépharose ne sont pas en quantité limitante.

Fig. 55 : Immunoprécipitation des monoamine oxydases de foie humain par les anticorps anti-M6 : effet de la quantité de protéines mitochondriales.

a) Mesure de la radioactivité présente dans le surnageant :



b) Mesure de la radioactivité présente dans le culot



Immunoprécipitation de quantités variables (10 à 70 µl) d'une solution mitochondriale solubilisée à 6 µg protéines/µl) de protéines mitochondriales de foie humain marquées à la pargyline tritiée (236 cpm/µg prot., soit environ 15 pmoles de pargyline fixées/mg de protéine) par 1 µl de sérum humain contenant (BIM, JAC) ou non (TEM), des anticorps anti-M6 à l'aide de protéine A Sépharose (volume réactionnel final de 150 µl). Comptage de la radioactivité en CPM (coups/min) dans le surnageant et dans le culot de précipitation d'une expérience type.

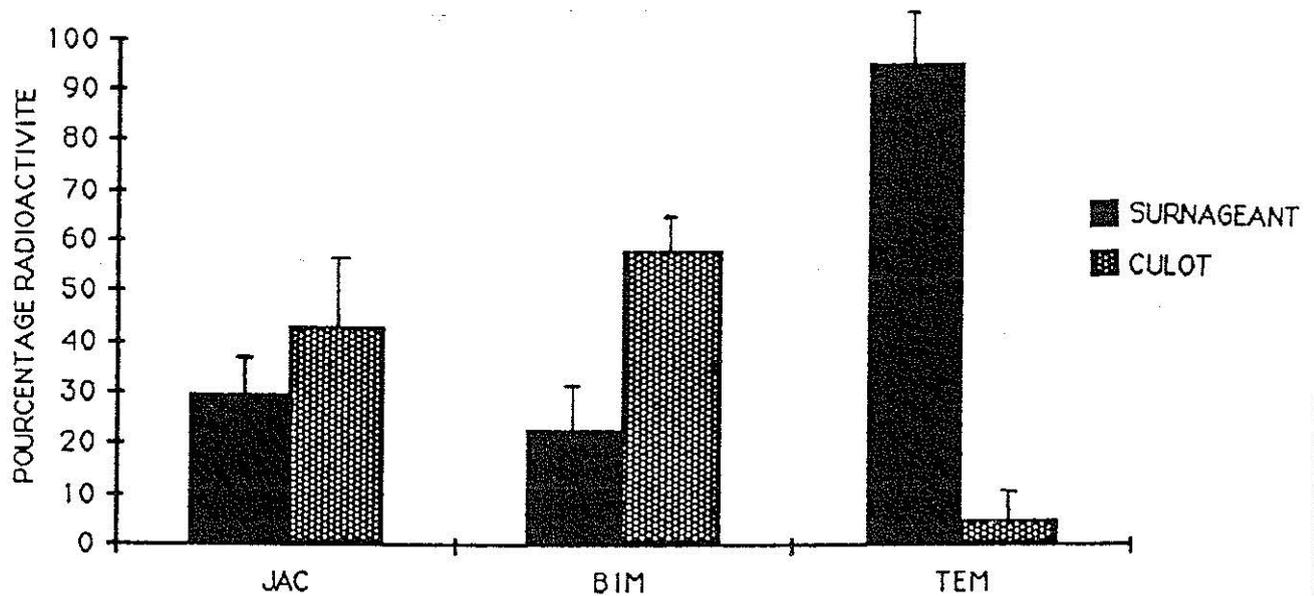
Le bilan de la radioactivité (addition pour une quantité de mitochondries donnée de la radioactivité présente dans le culot et dans le surnageant) est correct puisqu'il permet de retrouver environ 80 % de la radioactivité initiale, les lavages étant responsables de la perte de 20 %.

Si à partir des courbes de la figure 55, la radioactivité, correspondant à un sérum donné et à une quantité de mitochondries fixée (60 à 420  $\mu\text{g}$ ), est rapportée pour chaque point au  $\mu\text{g}$  de protéines mitochondriales et à la radioactivité initiale (236 cpm/ $\mu\text{g}$  protéine), les histogrammes de la figure 56 sont obtenus. Ils montrent que les sérums JAC et BIM précipitent tous deux (mais de façon plus importante pour BIM) la fraction mitochondriale radioactive. Le sérum témoin (TEM) ne conduit à aucune précipitation de cette fraction. Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-M6 reconnaissent les MAO présentes dans les mitochondries de foie humain puisque ce sont les seules protéines marquées par la pargyline (Figure 53, p. 155).

Une expérience analogue a été réalisée mais à partir d'une quantité fixe de mitochondries (40  $\mu\text{l}$  de la solution mitochondriale marquée à la pargyline et solubilisée soit 240  $\mu\text{g}$  de protéines) et de quantités variables de sérum humain (0,25 à 1  $\mu\text{l}$ ). Les résultats sont représentés dans la figure 57. Les courbes obtenues montrent que le sérum témoin (TEM) ne précipite pas les protéines mitochondriales marquées à la pargyline, la majeure partie de la radioactivité restant dans le surnageant. Par contre les sérums JAC et BIM reconnaissent les protéines radioactives. Le sérum BIM a une affinité pour celles-ci supérieure au sérum JAC puisque 0,25  $\mu\text{l}$  suffit pour atteindre le plateau maximum de précipitation.

Afin de confirmer la reconnaissance des MAO par les anticorps anti-M6, une autre expérience a été réalisée.

Fig. 56 : Immunoprécipitation des monoamine oxydases de foie humain par les anticorps anti-M6

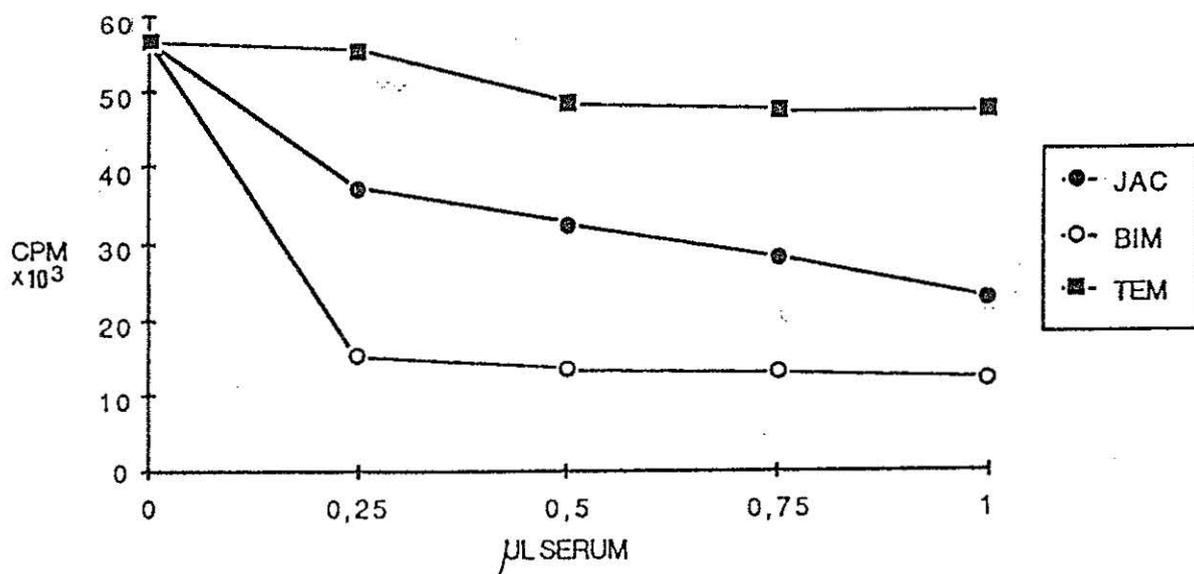


Pourcentage de radioactivité présente dans le culot et le surnageant, après immunoprécipitation de protéines mitochondriales marquées à la pargyline par des sérums humains contenant (JAC, BIM) ou non (TEM) des anticorps anti-M6, par rapport à la radioactivité initiale (100 % = 236 cpm/ $\mu$ g prot.).

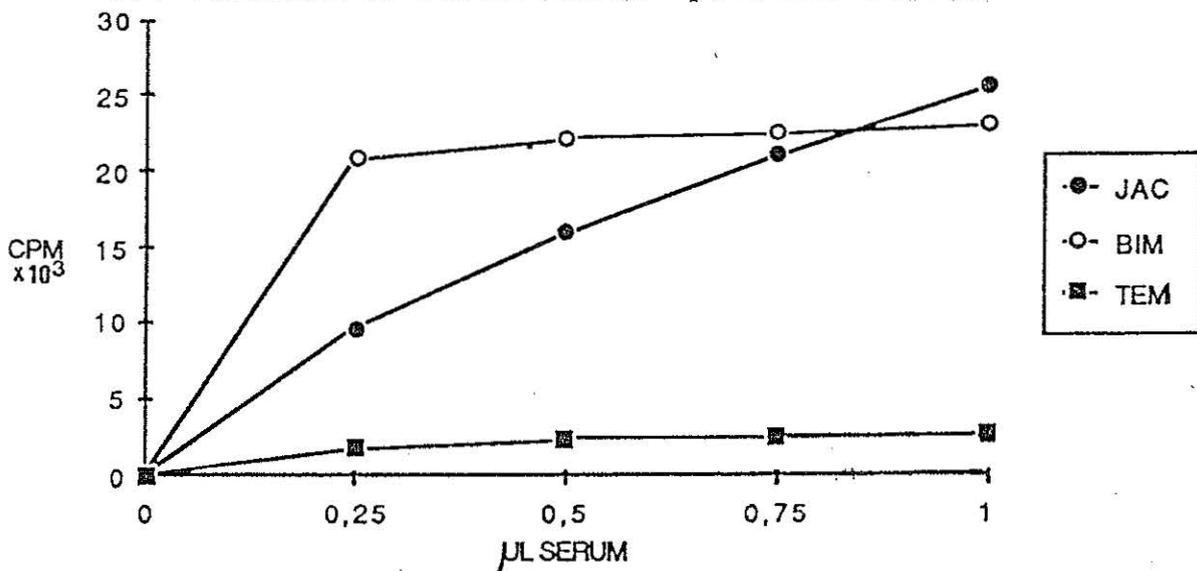
Représentation des valeurs moyennes  $\pm$  ES (n = 6 points) obtenues à partir de chaque courbe de la figure 55.

Fig. 57 : Immunoprécipitation des monoamine. oxydases de foie humain par les anticorps anti-M6 : effet de la quantité de sérum.

a) Mesure de la radioactivité présente dans le surnageant



b) Mesure de la radioactivité présente dans le culot.



Immunoprécipitation de protéines mitochondriales à partir de 40 µl d'une solution de protéines mitochondriales de foie humain (à 6 µg protéines/µl) marquées à la pargyline tritiée (236 cpm/µg prot., soit environ 15 pmoles de pargyline fixées par mg prot.), par différentes quantités de sérum humain (0,25 à 1 µl) contenant (BIM, JAC) ou non (TEM) des anticorps anti-M6. Comptage de la radioactivité en CPM (coups/min) dans le surnageant et dans le culot de précipitation d'une expérience type.

Le marquage des protéines mitochondriales de foie humain par la pargyline a été effectué cette fois-ci sur le surnageant obtenu après incubation des mitochondries avec les sérums humains et la protéine A-Sépharose. Dans ce cas, un marquage important et constant a été constaté quelles que soient les quantités de sérum témoin. En présence des sérums JAC et BIM, le taux de marquage est devenu faible et inversement proportionnel à la quantité de sérum. Ces résultats confirment la reconnaissance des MAO par les anticorps anti-M6. Par contre, ces anticorps n'inhibent pas directement le marquage des MAO par la pargyline. La préincubation des mitochondries en présence des sérums JAC et BIM ne permet pas d'inhiber l'activation et la fixation covalente irréversible de la pargyline sur les MAO. Cela a été observé pour différentes quantités de mitochondries et pour 10  $\mu$ l de sérum humain, le marquage obtenu étant proportionnel à la quantité de protéines et équivalent quels que soient les sérums. En fait, tous les anticorps anti-MAO décrits jusqu'alors se sont révélés incapables d'inhiber l'activation et la fixation covalente de la pargyline sur ces protéines (105, 106).

#### V.3.2. DIFFERENCIATION DES MAO A et B

Les anticorps anti-M6 reconnaissant les MAO, il était intéressant de rechercher si ces anticorps étaient spécifiquement dirigés contre l'une des deux MAO (A ou B). Pour cela l'expérience décrite dans la figure 55 a été répétée mais en préincubant les mitochondries de foie humain, préalablement au marquage par la pargyline, en présence de 1,6  $\mu$ M d'inhibiteurs spécifiques des formes A ou B, respectivement la clorgyline et le déprényl, pendant 60 min à 37°C, comme il a été décrit (102). Le marquage à la pargyline, qui était environ de 15 pmoles de pargyline fixées/mg protéines n'est plus que de 9 pmoles/mg protéines, soit environ 60 % après préincubation en présence de clorgyline, et de 0,6 pmoles/mg protéines, soit 4 %, lors d'une préincubation avec le déprényl. Les résultats de l'immuno-

précipitation de ces protéines mitochondriales par les sérums humains sont décrits dans la figure 58 (A et B)

Ils proviennent d'une expérience type (une autre expérience, effectuée indépendamment ayant donné des résultats similaires). Les histogrammes représentent la radioactivité présente dans le culot de précipitation ou le surnageant par rapport à la radioactivité totale initiale. Ils sont obtenus de façon identique à la figure 56 à partir de courbes d'immunoprécipitation (non montrées ici).

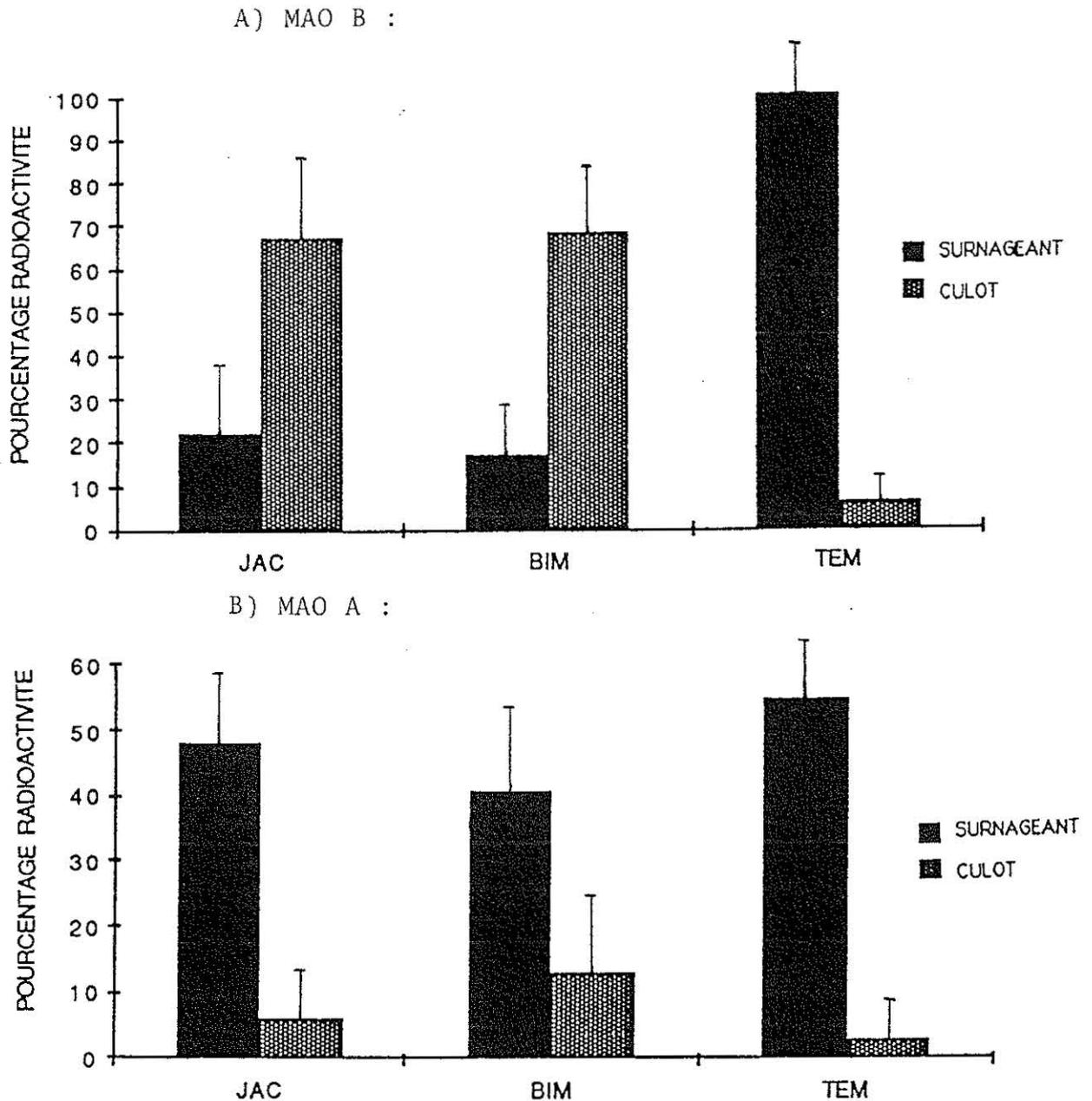
L'immunoprécipitation par les sérums humains de protéines mitochondriales dont le marquage par la pargyline tritiée de la MAO A a été inhibé par la clorgyline (seule la MAO B est marquée), est décrite dans la figure 58A.

En présence du sérum témoin (TEM), la quasi totalité de la radioactivité est retrouvée dans le surnageant. En ce qui concerne les sérums JAC et BIM, 70 % de la radioactivité totale initiale sont présents dans le culot de précipitation. Cela suggère que la MAO B est reconnue par les anticorps anti-M6.

La figure 58B illustre une expérience analogue où l'inhibition du marquage de la MAO B par la pargyline a été réalisée par le déprényl (seule la MAO A est radioactive). Dans ce cas, les sérums JAC et BIM précipitent peu la fraction mitochondriale radioactive, la majeure partie de la radioactivité se trouvant dans le surnageant.

Dans cette expérience, la radioactivité totale initiale n'est pas retrouvée et une perte d'environ 40 % est constatée, ce qui peut s'expliquer par les faibles taux de radioactivité mis en jeu (8 cpm/ $\mu$ g protéines) et donc une erreur de mesure importante. Ce résultat semble cependant indiquer que les

Fig. 58 : Immunoprécipitation des monoamine oxydases A ou B de foie humain par les anticorps anti-M6.



Pourcentage de radioactivité présente dans le culot et le surnageant après immunoprécipitation, par des sérums humains contenant (JAC, BIM) ou non (TEM) des anticorps anti-M6, de protéines mitochondriales préincubées en présence de clorgyline (A) ou de déprenyl (B) avant marquage à la pargyline tritiée (9 pmoles de pargyline fixées/mg. prot. (A) et 0,6 pmoles pargyline fixées/mg prot. (B)) par rapport à la radioactivité initiale (100 % = 134 cpm/ $\mu$ g prot. (A) et 8 cpm/ $\mu$ g prot. (B)). Représentation des valeurs moyennes  $\pm$  ES (n = 6 points) obtenues à partir de chaque courbe d'immunoprécipitation d'une expérience type non figurée ici.

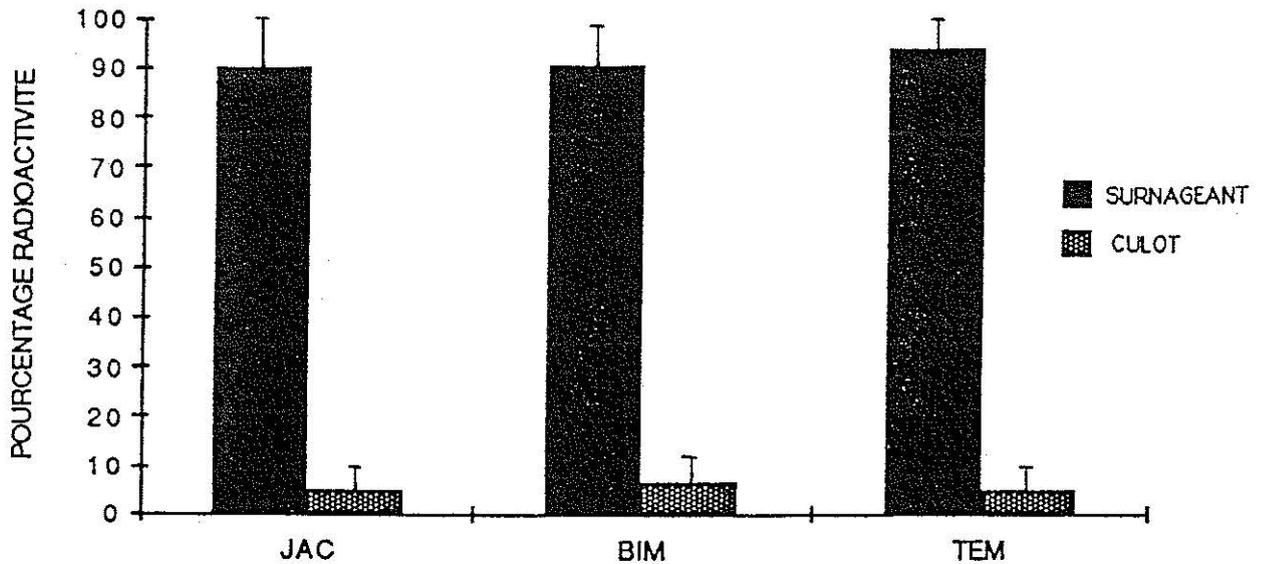
anticorps anti-M6 ne reconnaissent pas ou mal la MAO A. étant donné le faible marquage, la MAO A ne représentant qu'une faible proportion des MAO mitochondriales de foie humain, et des erreurs de mesure effectuées, il est possible que ce résultat ne soit pas significatif. Afin d'éclaircir ce point, une étude identique à celle décrite dans la figure 55 a été réalisée à partir de mitochondries de placenta humain qui contiennent presque exclusivement de la MAO A.

#### V.4. IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA MONOAMINE OXYDASE DE PLACENTA HUMAIN PAR LES ANTICORPS ANTI-M6

Des mitochondries de placenta humain, après marquage à la pargyline tritiée (342 cpm/ $\mu$ g protéine, soit environ 23 pmoles de pargyline fixées/mg protéine) et solubilisation, ont été incubées dans des conditions expérimentales analogues aux expériences précédentes, en présence de sérum humain et de protéine A Sépharose. Les résultats sont représentés figure 59 en pourcentage de la radioactivité totale retrouvée dans le culot ou le surnageant, comme pour les figures 56 et 58. Les trois sérums (BIM, JAC, TEM) ont un comportement identique. La quasi totalité de la radioactivité initiale est retrouvée dans le surnageant, montrant que les anticorps anti-M6 n'ont pas reconnu la MAO présente dans les mitochondries de placenta humain. Ces résultats peuvent être considérés comme significatifs, les taux de radioactivité étant importants.

Les anticorps anti-M6 seraient donc spécifiquement dirigés contre la MAO B des mitochondries de foie humain et ne reconnaîtraient pas (ou très faiblement) la MAO A. Un argument en cette faveur est la différence de localisation des MAO A et B sur la membrane externe des mitochondries. La forme A est présente sur la face interne de cette membrane et la forme B sur la face externe (107), donc plus accessible à un substrat, ce qui est compatible avec le mécanisme d'apparition des anticorps anti-M6 évoqué.

Fig. 59 : Interaction de la monoamine oxydase de placenta humain avec les anticorps anti-M6.



Pourcentage de radioactivité présente dans le culot et le surnageant après immunoprécipitation des protéines mitochondriales marquées à la pargyline (23 pmoles de pargyline fixées/mg prot.) par 1  $\mu$ l de sérum humain contenant (JAC, BIM) ou non (TEM) des anticorps anti-M6 par rapport à la radioactivité initiale (100 % = 342 cpm/ $\mu$ g prot.). Représentation des valeurs moyennes  $\pm$  ES (n = 6 points) obtenues à partir de chaque courbe d'immunoprécipitation d'une expérience type non figurée ici.

V.5. MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE RÉSIDUELLE DES MONOAMINE  
OXYDASES DES MITOCHONDRIES DE FOIE HUMAIN APRÈS IMMUNOPRÉCIPITATION  
PAR LES ANTICORPS ANTI-M6

Afin de confirmer la reconnaissance de la MAO par les anticorps anti-M6, il était intéressant d'effectuer une mesure de l'activité enzymatique résiduelle du surnageant obtenu après immunoprécipitation des protéines mitochondriales par ces anticorps. Des incubations ont été réalisées, dans les conditions expérimentales précédemment décrites, à partir de 240 µg de protéines mitochondriales de foie humain, de différentes quantités de sérum (0,25 à 1 µl) et de protéine A Sépharose.

L'activité enzymatique a été mesurée dans 50 µl de surnageant obtenu après chaque immunoprécipitation. Le substrat choisi est un substrat commun aux MAO A et B, la tyramine marquée au  $^{14}\text{C}$  sur le  $\text{CH}_2$  benzylique. La réaction d'oxydation de la tyramine par les MAO a été décrite dans la figure 48 (p. 150). La mesure d'activité est basée sur la différence de solubilité entre le composé initial (chlorhydrate de tyramine soluble en milieu acide) et le produit d'oxydation (aldéhyde extrait par un mélange toluène-acétate d'éthyle (v/v)).

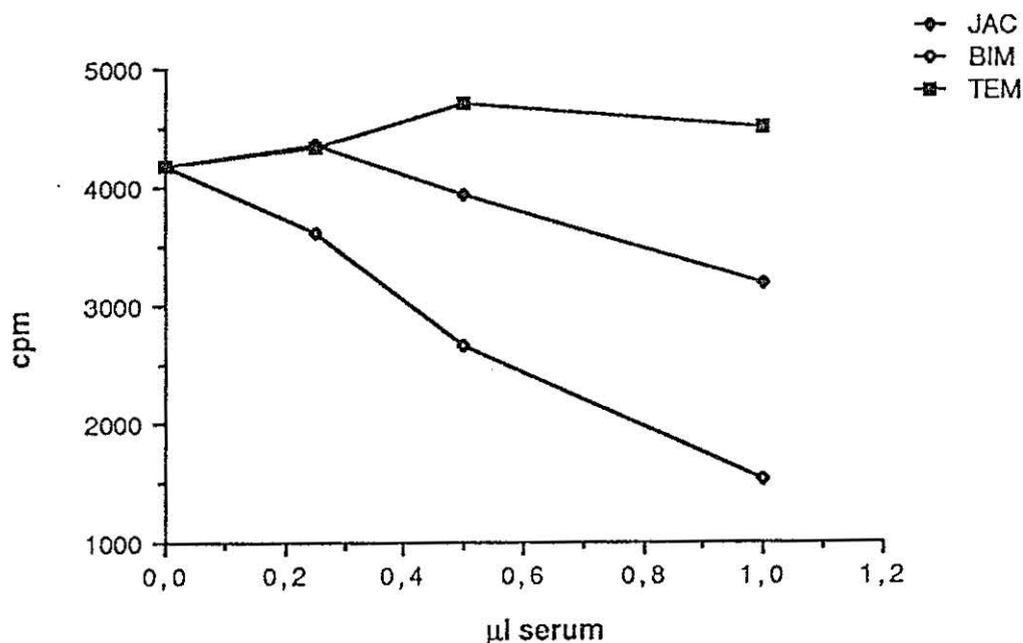
L'activité enzymatique de la MAO vis-à-vis de la tyramine a été mesurée comme il a été décrit par RUSSEL et coll. (108). Après chaque immunoprécipitation, les 50 µl obtenus du surnageant sont incubés en présence de tyramine radioactive (45 µM final) pendant 15 min à 37°C. La réaction est arrêtée par HCl 0,5 M. La radioactivité est comptée dans la phase organique après extraction.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 60. L'activité enzymatique mesurée est constante quelles que soient les quantités de sérum témoin (TEM) utilisées mais diminue proportionnellement aux quantités de sérum JAC ou BIM

ajoutées, le sérum BIM se révélant plus efficace à précipiter la MAO que le sérum JAC.

Ces données viennent conforter les résultats précédemment observés en ce qui concerne la reconnaissance de la MAO par les anticorps anti-M6.

Fig. 60 : Immunoprécipitation de la monoamine oxydase de foie humain par les anticorps anti-M6 : mesure de l'activité enzymatique résiduelle dans le surnageant.



Mesure de l'activité enzymatique de la MAO de foie humain présente dans le surnageant après immunoprécipitation de protéines mitochondriales de foie humain par des sérums humains contenant (JAC, BIM) ou non (TEM) des anticorps anti-M6.

Incubation pendant 15 min à 37°C de 50 µl de surnageant, obtenu à partir de 240 µg de protéines mitochondriales, en présence de 20 µl de tyramine marquée au  $^{14}\text{C}$  (45 µM final dans un volume final de 220 µl). Comptage de la radioactivité présente dans la phase organique après extraction du produit d'oxydation. Représentation de la valeur moyenne obtenue à partir de 2 incubations.

## V.6. RECONNAISSANCE PAR IMMUNO-TRANSFERT DE PROTÉINES MITOCHONDRIALES DE FOIE HUMAIN PAR LES ANTICORPS ANTI-M6

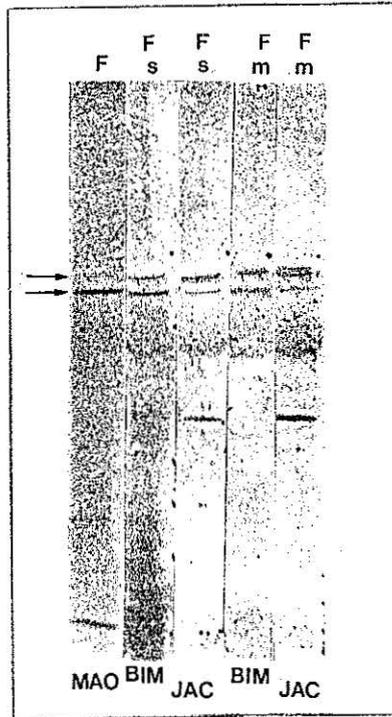
La reconnaissance par immuno-transfert de protéines mitochondriales de foie humain par les sérums humains contenant des anticorps anti-M6 s'est révélée difficile à interpréter. La faible proportion des MAO parmi les protéines mitochondriales de foie humain pouvait expliquer cela.

Un sérum polyclonal de mouton contenant des anticorps anti-MAO B de foie humain et un sérum monoclonal de souris contenant des anticorps dirigés contre cette même protéine ont permis d'enrichir en MAO B des fractions mitochondriales de foie humain.

Pour cela, des protéines mitochondriales solubilisées ont été incubées en présence de sérum de mouton. Le précipité formé (Fm), recueilli par centrifugation et solubilisé par du SDS, a été déposé sur gel de polyacrylamide, et révélé après transfert sur nitrocellulose par les sérums BIM et JAC. La même expérience a été réalisée avec le sérum monoclonal de souris. Dans ce cas, une incubation supplémentaire en présence d'immunoglobulines dirigées contre les anticorps de souris a été nécessaire pour l'obtention du précipité (Fs), les anticorps monoclonaux n'étant pas directement précipitants.

Les résultats de l'immunorévélation sont représentés dans la figure 61. Le sérum de mouton contenant des anticorps anti-MAO B révèle de façon majoritaire une bande protéique (60 kd environ) dans les protéines mitochondriales de foie humain (F). Une protéine de poids moléculaire identique est révélée par les sérums BIM et JAC dans les précipités de protéines mitochondriales de foie humain à l'aide des sérums de mouton (Fm) ou de souris (Fs). Une autre protéine de poids moléculaire plus élevé (64 kd environ) est également révélée par ces deux sérums humains.

Fig. 61 : Reconnaissance par immuno-transfert de protéines mitochondriales de foie humain par des anticorps anti-M6.



Electrophorèse sur gel SDS / polyacrylamide (9 %) de 16  $\mu$ g de protéines mitochondriales de foie humain totales (F), précipitées par un sérum de souris (Fs) ou de mouton (Fm) contenant des anticorps anti-MAO B, transfert sur nitrocellulose et immunorévélation par des sérums humains contenant des anticorps anti-M6 (JAC, BIM) ou par un sérum de mouton contenant des anticorps anti-MAO B (MAO) dilués respectivement au 1/100<sup>e</sup> et 1/500<sup>e</sup>

Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-M6 présents dans les sérums humains JAC et BIM reconnaissent par immuno-transfert deux protéines mitochondriales de foie humain immunoprécipitées par des anticorps anti-MAO B dont l'une semble être la MAO B.

#### V.7: CONCLUSION

D'après les résultats obtenus, il s'avère que les anticorps anti-M6 immunoprécipitent les MAO mitochondriales de foie humain, celles-ci étant détectées grâce à un marquage spécifique par de la pargyline tritiée. Une inhibition sélective de ce marquage par une préincubation des mitochondries en présence d'inhibiteur de MAO A ou B, respectivement la clorgyline et le déprényl, ou l'utilisation de mitochondries de placenta humain (ne contenant que la MAO A), permettent de montrer que les anticorps anti-M6 reconnaissent plus particulièrement la MAO B. Deux arguments vont dans ce sens : le taux d'immunoprécipitation des MAO par les sérums humains JAC et BIM et la chute d'une activité MAO dépendante après immunoprécipitation de ces mêmes protéines par ces sérums.

En ce qui concerne le mécanisme d'apparition des anticorps anti-M6, plusieurs faits peuvent être évoqués. L'iproniazide est métabolisé en isopropylhydrazine, elle-même transformée par les cytochromes P-450 en métabolites alkylants. Or, l'iproniazide est connu pour inhiber de façon irréversible les MAO et les hydrazines pour se fixer de façon irréversible sur les MAO. Ces éléments suggèrent que l'isopropylhydrazine soit activée par les MAO et s'y fixe de façon covalente comme les autres hydrazines. Le travail de UNDEFRIEND (95) bien qu'ancien, montre que l'isopropylhydrazine se fixe irréversiblement sur la MAO de foie de cochon d'Inde.

Le couple iproniazide-MAO B pourrait jouer un rôle analogue à celui de l'acide tiénilique et du cytochrome P-450-8 ce qui permettrait de généraliser le mécanisme d'apparition d'auto-anticorps décrit dans la figure 12 (p. 35).

# CONCLUSION GENERALE

Le but de ce travail était d'apporter des informations sur les mécanismes moléculaires qui sont à l'origine de certaines hépatites médicamenteuses de type immuno-allergique.

En fait, nous nous sommes plus particulièrement intéressée aux mécanismes de l'apparition d'anticorps anti-tissus au cours de ces hépatites, à partir d'une hypothèse qui venait d'être proposée (55) pour l'apparition d'anticorps anti-LKM2 dans le sérum de patients ayant fait une hépatite après prise d'acide tiénilique. Les anticorps anti-LKM2 sont dirigés contre une protéine hépatique humaine, le cytochrome P-450-8(IIC), qui est responsable de l'activation métabolique de l'acide tiénilique. Selon le mécanisme postulé, une séquence d'événements serait à l'origine de ces auto-anticorps : la transformation de l'acide tiénilique par le cytochrome P-450-8 en métabolites réactifs, l'alkylation de ce cytochrome P-450 par ces métabolites et le passage du cytochrome P-450-8 alkylé au niveau de la membrane plasmique de l'hépatocyte où il serait reconnu par le système immunitaire.

Dans un premier temps, et dans le mesure où le test de détection clinique des anticorps anti-LKM2 dans le sérum de patients est réalisé à partir de coupes de foie de rat, il a été tenté de déterminer les protéines microsomales hépatiques de rat capables d'être reconnues par les anticorps anti-LKM2 (réactivité croisée). Par trois approches différentes, il a été montré que la protéine hépatique de rat, majoritairement reconnue par les anticorps anti-LKM2, est un cytochrome P-450 abondant chez des animaux non traités, le cytochrome P-450-UT-A(IIC11).

Deux autres protéines, les cytochromes P-450-PB-B(IIB1) et PB-D(IIB2) sont plus faiblement reconnues par ces anticorps. Elles présentent une certaine homologie de séquence (supérieure

à 50 %) avec le cytochrome P-450-UT-A(IIC11). La reconnaissance d'une forme constitutive de cytochrome P-450 hépatique de rat par les sérums humains contenant des anticorps anti-LKM2 permet d'expliquer le succès du test de détection de ces auto-anticorps pratiqué par le Pr. HOMBERG sur coupes de foie de rat non traité. La forte homologie de séquence (76 %) existant entre le cytochrome P-450-UT-A(IIC11) de rat et les cytochromes P-450 humains de la sous-famille IIC rend compréhensible la réactivité croisée observée entre anticorps anti-LKM2 (dirigés contre le cytochrome P-450-8(IIC) et cette forme constitutive de cytochrome P-450 hépatique de rat.

La faible reconnaissance, par les anticorps anti-LKM2, des autres isoenzymes du cytochrome P-450 de foie de rat, explique que le traitement des rats par différents inducteurs, comme le phénobarbital, le clofibrate, la  $\beta$ -naphtoflavone, le triacétate d'oléandomycine, n'améliore pas la détection de ces auto-anticorps sur coupes de foie de ces rats.

Après avoir montré que l'acide tiénilique ou son isomère étaient, chez le Rat aussi bien que chez l'Homme, transformés en métabolites réactifs et que les anticorps anti-LKM2 reconnaissaient une protéine hépatique de rat, il a été élaboré, dans une deuxième partie, un modèle d'étude animal de l'éventuelle apparition d'un cytochrome P-450 au niveau de la membrane hépatocytaire. Il a été mis en évidence qu'un traitement des rats par certains inducteurs puis par l'acide tiénilique, conduit à l'apparition, à la surface des hépatocytes, d'un nouvel antigène reconnu par les anticorps anti-LKM2. Ce phénomène, très faible chez des rats traités par l'acide tiénilique seul, devient très net lors du traitement des rats par le clofibrate, puis par l'acide tiénilique. Les autres inducteurs utilisés dans cette étude, le phénobarbital, le fénofibrate, le méthyl-3 cholanthrène, ne permettent pas l'apparition d'un phénomène aussi intense. Enfin, il faut observer que le traitement des rats par les inducteurs seuls ne conduit pas à l'apparition, à la surface des hépatocytes, de nouveaux antigènes reconnus par les anticorps anti-LKM2.

Dans une troisième partie, notre intérêt s'est porté sur un autre médicament, l'iproniazide, qui est aussi responsable de phénomènes hépatotoxiques de type immuno-allergique. Dans le sérum des patients ayant présenté une hépatite après prise d'iproniazide, des anticorps anti-mitochondries (anti-M6) ont été détectés. Il a donc été tenté d'expliquer l'apparition de ces anticorps anti-tissus. Une étude de la reconnaissance, par les sérums humains contenant des anticorps anti-M6, des protéines mitochondriales de foie humain a permis de montrer que ces anticorps sont dirigés contre une enzyme de la membrane externe des mitochondries, la monoamine oxydase B. L'iproniazide est connu pour être métabolisé en isopropylhydrazine et pour inhiber irréversiblement les MAO. Or, les hydrazines sont transformées par les MAO en métabolites réactifs alkylants. Il apparaît donc hautement probable que la MAO B puisse activer l'isopropylhydrazine en métabolites alkylants.

Ces études concernant l'apparition d'anticorps anti-tissus lors d'effets hépatotoxiques liés à l'acide tiénilique ou à l'iproniazide, ont permis de déterminer les protéines spécifiquement reconnues par ces auto-anticorps. Elles ont également mis en évidence l'importance des couples acide tiénilique-cytochrome P-450-8 et iproniazide-MAO B dans les phénomènes toxiques déclenchés par ces deux médicaments.

Il s'agit des premiers résultats concernant la détermination des antigènes responsables de l'apparition d'anticorps anti-tissus dans des hépatites médicamenteuses de type immuno-allergique. Il faut remarquer que les protéines spécifiquement reconnues par ces auto-anticorps sont celles qui sont principalement responsables de l'activation métabolique, avec formation de métabolites réactifs, de ces médicaments. Ces résultats sont donc en faveur d'un mécanisme où l'alkylation de protéines par des métabolites réactifs du médicament serait le facteur déclenchant de ces phénomènes hépatotoxiques.

En fait, l'acide tiénilique et l'iproniazide conduisent à l'apparition d'anticorps anti-tissus très spécifiques, non rencontrés dans d'autres types d'hépatites. Cela renforce l'idée que le cytochrome P-450-8. et la MAO B sont non seulement reconnus par les anticorps anti-LKM2 ou anti-M6 mais seraient également les antigènes responsables de l'apparition des ces anticorps in vivo.

Le problème s'avère plus complexe dans le cas d'autres hépatites de type immuno-allergique. Ainsi, dans les hépatites chroniques actives (CAH), il a été récemment établi que les anticorps anti-LKM1, détectés dans le sérum de ces patients, reconnaissent un cytochrome P-450 de foie humain, le cytochrome P-450-buf I ou II (77) ou db1 (78) de la sous-famille IID. Toutefois, dans ces hépatites, aucune origine médicamenteuse ou exogène n'a pu être mise en évidence.

Dans le cas du lupus érythémateux disséminé (SLE), les anticorps anti-ADN détectés dans le sérum de ces malades réagissent non seulement avec l'ADN mais aussi avec des phospholipides et une protéine membranaire (109). De telles réactions croisées, entre anticorps et différentes macromolécules, peuvent donc conduire à des erreurs dans la détermination des antigènes véritables à l'origine de l'apparition d'auto-anticorps.

Il a également été proposé que des virus soient la cause de certaines réactions auto-immunes, soit par l'expression d'antigènes viraux à la surface de cellules infectées, soit par le biais d'auto-anticorps anti-virus dont les idiotypes peuvent donner lieu à des réactions croisées avec certains auto-antigènes (110).

Une autre hypothèse pour l'apparition d'auto-anticorps dans le cas du lupus érythémateux disséminé fait intervenir la métabolisation des médicaments par les myéloperoxydases présentes dans les cellules circulantes (monocytes, neutrophiles). L'interaction du médicament et de ces cellules conduit à la présentation d'un néo-antigène par ces cellules, puis à la production d'anticorps par l'intermédiaire des lymphocytes B (111).

Les cas de l'acide tiénilique et de l'iproniazide sont moins complexes dans la mesure où les anticorps anti-tissus observés sont très spécifiques des accidents hépatotoxiques déclenchés par ces médicaments. De plus, comme il a été énoncé précédemment, les protéines reconnues par ces auto-anticorps, le cytochrome P-450-8 ou la MAO B, sont impliquées majoritairement dans l'activation métabolique de ces médicaments. La probabilité que les antigènes responsables de l'apparition de ces anticorps soient d'autres protéines (réactivité croisée) paraît faible.

Il reste à élucider de nombreux points dans le mécanisme qui est proposé pour l'apparition d'anticorps anti-tissus dans les cas d'hépatites à l'acide tiénilique ou à l'iproniazide. Parmi ceux-ci, deux points semblent cependant importants à souligner. Le premier concerne le processus par lequel le néo-antigène apparaît au niveau de la membrane plasmique hépatocytaire. Le cytochrome P-450 alkylé migrerait vers la membrane plasmique, mais sans passer par l'appareil de Golgi. Des études sont actuellement en cours sur le trafic membranaire afin de déterminer le mécanisme de migration. Une autre hypothèse, récemment émise, est la formation du métabolite réactif directement au niveau de la membrane plasmique où la présence d'une faible quantité de cytochromes P-450 a été démontrée (84).

Le second point concerne l'origine de la fréquence faible de ces phénomènes immuno-allergiques (1 cas/10.000). Un facteur génétique est suspecté, mais aucune étude n'a pu mettre en évidence un déterminant antigénique prédisposant à ce type d'hépatite, le nombre restreint de malades ne permettant pas d'études statistiques. Chez ces patients ayant présenté un accident hépatique, une anomalie du métabolisme peut être évoquée (modification de cytochromes P-450; déficience enzymatique...) mais aussi une perturbation du système immunitaire (déficit en cellules T suppressives...) (112).

Les résultats obtenus ne permettent pas de répondre à ces questions. Ils apportent par contre un premier ensemble de faits à partir desquels ces mécanismes peuvent être étudiés.

B I B L I O G R A P H I E

=====

1. MACKAY I.A. (1985)  
Induction by drugs of hepatitis and autoantibodies to cell organelles : significance and interpretation.  
Hepatology, 5, 5 : 904-906.
2. BIOUR M., POUPON R., CALMUS Y., GRANGE J.D., HAMEL J.D., LEVY V.G., BODIN F., CHEYMOL G. (1988)  
Hépatotoxicité des médicaments.  
Gastroenterol. Clin. Biol., 12 : 48-60.
3. BENHAMOU J.P. (1988).  
Drug-induced hepatitis : clinical aspects.  
Liver cells and drugs. Ed. A. Guillouzo. Coll. INSERM, 164, pp. 3-12.
4. NEUBERGER J.M., KENNA J.G., WILLIAMS R. (1987)  
Halothane hepatitis : attempt to develop an animal model.  
Int. J. Immunopharmacol., 9, 2 : 123-131.
5. LUCIANO J.J., RAYMOND-GELLE M.C., HOANG W.D. (1986)  
Hépatites médicamenteuses : mise au point.  
L.M.M. Médecine du Sud-Est, XXII, 6 : 10472-10477.
6. PESSAYRE D., LARREY D. (1988)  
Mechanisms of drug-induced hepatitis.  
Liver cells and drugs. Ed. A. Guillouzo. Coll. INSERM, 164, pp. 129-142.
7. PARK B.K., COLEMAN J.W., KITTERINGHAM N.R. (1987)  
Drug disposition and drug hypersensibility.  
Biochem. Pharmacol., 36, 5 : 581-590.
8. CALMUS Y., BIOUR M., POUPON R. (1987)  
Les tests in vitro dans le diagnostic des hépatites médicamenteuses.  
Gastroenterol. Clin. Biol., 11 : 586-598.

9. GUENGERICH F.P., LIEBLER D.C. (1985)  
Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites.  
Crit. Rev. Toxicol., 14, 3 : 259-307.
10. MANSUY D. (1979)  
Activation des composés organiques exogènes par les  
cytochromes P-450.  
Mises au point de Biochimie pharmacol. : 123-146.
11. MUELLER G.C., MILLER J.A. (1948)  
The metabolism of 4-dimethylamino-azobenzene by rat liver  
homogenates.  
J. Biol. Chem., 176 : 535-544.
12. MUELLER G.C., MILLER J.A., GLASSNER M. (1953).  
The metabolism of methylated aminoazo dyes.  
J. Biol. Chem., 202, 579-587.
13. BRODIE B.B., GILLETTE J.R., LA DU B.N. (1958).  
Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds.  
Annu. Rev. Biochem., 27 : 427-434.
14. KLINGENBERG M. (1958).  
Pigments of rat liver microsomes.  
Arch. Biochem. Biophys., 75 : 376-386.
15. GARFINKEL D. (1958)  
Studies on pig liver microsomes. I. Enzymatic and pigment  
composition of different microsomal fractions.  
Arch. Biochem. Biophys., 77 : 493-509.
16. OMURA T., SATO R. (1964).  
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.  
II. Solubilization, purification and properties.  
J. Biol. Chem., 239, 7 : 2379-2385.
17. RUCKPAUL K., BERNHARDT R. (1984).  
Biochemical aspects of the monooxygenase system in the  
R.E. of mammalian liver.  
Cytochrome P-450 Ed. K. Ruckpaul and H. Rein. Academie,  
Verlag, Berlin, pp. 11-57.

18. OKEY A.B., ROBERTS E.A., HARPER P.A., DENISON M.S. (1986)  
Induction of drug-metabolizing enzymes : mechanisms and consequences.  
Clin. Biochem. 19 : 132-141.
19. NEBERT D.W., NELSON D.R., ADESNIK M., COON M.J., ESTABROOK R.W., GONZALEZ F.J., GUENGERICH F.P., GUNSALUS I.C., JOHNSON E.F. KEMPER B., LEVIN W., PHILIPPS I.R., SATO R., WATERMAN M.R. (1989).  
The P-450 superfamily : updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci.  
D.N.A., 8, 1 : 1-13.
20. WOLF R.C. (1986)  
Cytochrome P-450s : polymorphic multigene families involved in carcinogen activation.  
Trends Genet.: 209-214.
21. WAXMAN D.J. (1986)  
Rat hepatic cytochrome P-450.  
Cytochrome P-450. Ed. P.R. Ortiz de Montellano, Academic Press, pp. 525-539.
22. BLACK S.D., COON M.J. (1986)  
Comparative structures of P-450 cytochromes.  
Cytochrome P-450. Ed. P.R. Ortiz de Montellano, pp. 161-215.
23. GUENGERICH F.P. (1987)  
Cyt. P-450 enzymes and drug metabolism.  
Progress in drug metabolism, Ed. Bridges J.W., Chasseaud L.F. and Gibson G.G., Taylor and Francis, 10, pp. 1-53.
24. GUENGERICH F.P., DANNAN G.A., WRIGHT S.T., MARTIN M.V., KAMINSKY L.S. (1982).  
Purification and characterization of liver microsomal cytochrome P-450 : electrophoretic, spectral, catalytic and immunochemical properties and inducibility of 8-isozymes isolated from rats treated with PB or BNF.  
Biochemistry, 21 : 6019-6030.

25. BEAUNE P., GED C., CRESTEIL T., LEROUX J.P., KREMERS P. KAMINSKY L.S., GUENGERICH F.P. (1986).  
Human liver microsomal cytochrome P-450.  
Porphyrins and porphyrias. Y. Nordmann Ed. Coll. INSERM, 134 : pp. 95-99.
26. GUENGERICH F.P., UMBENHAUER D.R., CHURCHILL P.F., BEAUNE P.H., BÖCKER R., KNODELL R.G., MARTIN M.V., LLOYD R.S. (1987).  
Polymorphism of human cytochrome P-450.  
Xenobiotica, 17, 3 : 311-316.
27. MEIER U.T., DAYER P., MALE P.J., KRONBACH T., MEYER U.A. (1985)  
Mephenytoin hydroxylation polymorphism : characterization of the enzymatic deficiency in liver microsomes of poor metabolizers phenotyped in vivo.  
Clin. Pharmacol. Ther., 38 : 488-494.
28. WANG P.P., BEAUNE P., KAMINSKY L.S., DANNAN G.A. KADLUBAR F.F., LARREY D., GUENGERICH F.P. (1983)  
Purification and characterization of six cytochrome P-450 isozymes from human liver microsomes.  
J. Biol. Chem., 22 : 5375-5383.
29. GUT J., MEIER U.T., CATIN T., MEYER U.A. (1986)  
Mephenytoin-type polymorphism of drug oxidation purification and characterization of a human liver cytochrome P-450 isozyme catalysing microsomal mephenytoin hydroxylation.  
Biochem. Biophys. Acta, 884, 3 : 435-447.
30. SHIMADA T., MISONO K.S., GUENGERICH F.P. (1986)  
Human liver microsomal cytochrome P-450 mephenytoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxydative drug metabolism.  
J. Biol. Chem., 261, 2 : 909-921.
31. UMBENHAUER D.R., MARTIN M.V., LLOYD R.S., GUENGERICH F.P. (1987).  
Cloning and sequence determination of a complementary DNA related to human liver microsomal cytochrome P-450 S-mephenytoin 4-hydroxylase.  
Biochemistry, 26 : 1094-1099.

32. LEO M.A., LASKER J.M., RAUCY J.L., KIM C.I., BLACK M.,  
LIEBER C.S. (1989)  
Metabolism of retinol and retinoic acid by human liver  
cytochrome P-450 IIC8.  
Arch. Biochem. Biophys., 269, 1 : 305-312.
33. GED C., UMBENHAUER D.R., BELLEW T.M., BORK R.W.,  
SRIVASTAVA P.K., SHMRIKI N., LLOYD R.S., GUENGERICH F.P. (1988)  
Characterization of cDNAs, mRNAs and proteins related to  
human liver microsomal cytochrome P-450(S)-mephenytoin  
4'-hydroxylase.  
Biochemistry, 27, 6929-6940.
34. PESSAYRE D. (1986)  
Mécanisme des hépatites médicamenteuses.  
Med. Sci., 2 : 373-379.
35. KAPLOWITZ N., AW T.Y., SIMON F.R., STOLZ A. (1986)  
Drug-induced hepatotoxicity.  
Annal. Intern. Med., 104 : 826-839.
36. ORTIZ DE MONTELLANO P. (1988)  
Suicide substrates for drug metabolizing enzymes : mechanisms  
and biological consequences.  
Progress in drug metabolism, Ed. Gibson G.G., Taylor and Francis  
11, pp.99-148.
37. SARTORI E. (1986)  
Effet des antibiotiques macrolides sur le cytochrome P-450  
hépatique. Contribution à l'étude de certaines interactions  
médicamenteuses.  
Thèse de Doctorat de l'Université PARIS VI, Spécialité  
Sciences physiques.
38. HOMBERG J.C. (1987)  
Les anticorps anti-tissus en pathologie hépatique.  
Conc. Méd., 109, 42 : 4050-4055.

39. ROITT I.M., DONIACH D. (1972)  
Immunofluorescent tests for the detection of antibodies  
WHO booklet of immunological techniques, Geneva, WHO, pp.1-12.
40. HOMBERG J.C., ABUAF N., HELMY-KHALIL S., BIOUR M.,  
POUPON R., ISLAM S., DARNIS F., LEVY V.G., OPOLON P.  
BEAUGRAND M., TOULET J., DANAN G., BENHAMOU J.P. (1985)  
Drug-induced hepatitis associated with anticytoplasmic  
organelle autoantibodies.  
Hepatology, 5, 5 : 722-727.
41. HOMBERG J.C., ANDRE C., ABUAF N. (1984).  
A new anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM2)  
in tienilic acid-induced hepatitis.  
Clin. Exp. Immunol., 55 : 561-570.
42. HOMBERG J.C., STELLY N., ANDREIS I., ABUAF N., SAADOUN F.,  
ANDRE J. (1982).  
A new antimitochondrial antibody (anti-M6) in iproniazid-  
induced hepatitis.  
Clin. Exp. Immunol., 47 : 93-102.
43. BOCCACCIO F., ATTALI P., NATAF J., INK O., FABRE M.,  
PELLETIER G. (1987)  
Hépatite due à la dihydralazine.  
Gastroenterol. Clin. Biol., 11 : 614.
44. SCHMIT J.L., GAUCHER P., BIGARD M.A., RAUBER G.,  
CHAMPIGNEULLE B., BRUCKER P., MONERET-VAUTRIN D.A. (1985)  
L'hépatite maligne à l'halothane.  
Annales Médicales de Nancy et de l'Est, 24, pp.213-216.
45. WALTON B., SIMPSON B.R., STRUNIN L., DONIACH D., PERRIN J.,  
APPLEYARD A.J. (1976)  
Unexplained hepatitis following halothane.  
Brit. Med. J. 1 : 1171-1176.

46. DAVIS M. (1983)  
Toxic and immunological mechanisms in halothane hepatitis.  
Immunotoxicology. Ed Gibson G.G., Rubbard R. and  
Parke D.V., Academic Press, London, pp. 171-180.
47. MANSUY D. (1987)  
A chemical approach to reactive metabolites.  
Drug Metabolism from Molecules to Man, Ed. by Benford D.,  
Bridges J., Gibson G., Taylor and Francis, pp. 669-678.
48. SATOH H., GILLETTE J.R., DAVIES H.W., SCHULICK R.D.,  
POHL L.R. (1985)  
Immunochemical evidence of trifluoroacetylated cytochrome  
P-450 in the liver of halothane-treated rats.  
Mol. Pharmacol., 28 : 468-474.
49. SATOH H., FUKUDA Y., ANDERSON D.K., FERRANS V.J.,  
GILLETTE J.R., POHL L.R. (1985)  
Immunological studies on the mechanism of halothane-induced  
hepatotoxicity : immuno-histochemical evidence of trifluoro-  
acetylated hepatocytes.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 233, 3 : 857-862.
50. ZIMMERMAN H.J., LEWIS J.H., ISHAK K.G., MADDREY W.C. (1984)  
Ticrynafen-associated hepatic injury analysis of 340 cases.  
Hepatology, 4, 2 : 315-323.
51. MANSUY D., DANSETTE P.M., FOURES C., JAOUEN M., MOINET G.,  
BAYER N. (1984)  
Metabolic hydroxylation of the thiophene ring : isolation  
of 5-hydroxy-tienilic acid as the major urinary metabolite  
of tienilic acid in man and rat.  
Biochem. Pharmacol., 33 : 1429-1435.
52. DANSETTE P.M., AMAR C., SMITH C.B., NEAU E., PONS C.,  
MANSUY D. (1988)  
Hydroxylation of the thiophene ring : in vitro the 5-hydroxy-  
lation of tienilic acid is catalysed by cytochrome P-450  
in rat and human microsomes.  
Cytochrome P-450 : biochemistry and biophysics. Ed.  
Schuster I, Taylor and Francis, pp. 751-754.

53. DANSETTE P.M., AMAR C., PONS C., MANSUY D. (1989)  
Oxidative activation of the thiophene ring by hepatic enzymes : hydroxylation and formation of electrophilic metabolites during metabolism of tienilic acid and its isomer by rat liver microsomes.  
Biochem. Pharmacol. à paraître.
54. LAFAY J.P. (1981)  
Les atteintes hépatiques associées à l'anticorps anti-microsome de foie et de rein de type 2 ; rôle de l'acide tiénilique.  
Thèse de Doctorat en Médecine, Université Paris Val de Marne, Faculté de Médecine de Créteil.
55. BEAUNE P., DANSETTE P.M., MANSUY D., KIFFEL L., FINCK M. AMAR C., LEROUX J.P., HOMBERG J.C. (1987).  
Human anti-endoplasmic reticulum auto-antibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug.  
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84 : 551-555.
56. CRESTEIL T., BEAUNE P., KREMERS P., CELIER C., GUENGERICH F.P. LEROUX J.P. (1985)  
Immunoquantification of epoxide hydrolase and cytochrome P-450 isozymes in fetal and adult human liver microsomes.  
Eur. J. Biochem., 151 : 345-352.
57. HERBERT M., PICHAT L. (1976)  
Synthèse d'un diurétique marqué au  $^{14}\text{C}$ :acide dichloro, 2,3-(thénoyl-2  $^{14}\text{C}=\text{O}$ )-4-phénoxy acétique.  
J. Label Compound Radiopharm, 12 : 437-453.
58. BEAUNE P., FLINOIS J.P., KIFFEL L., KREMERS P., LEROUX J.P. (1985)  
Purification of a new cytochrome P-450 from human liver microsomes.  
Biochem. Biophys. Acta, 840 : 364-370.
59. OMURA T., SATO R. (1962)  
The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes.  
J. Biol. Chem., 237 : 1375-1376.

60. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1961)  
Protein measurement with the folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem., 193 : 265.
61. WEYLER W., SALACH J.I. (1985)  
Purification and properties of mitochondrial MAO type A  
from human placenta.  
J. Biol. Chem., 260, 24 : 13199-13207.
62. BANCELLS L.L., BALSAL D., GOMEZ N., UNZETA M. (1987)  
Effects of nondenaturing zwitterionic detergent chaps,  
3- (3-cholamidopropyl)dimethylammonio 1-propanesulfonate,  
on rat liver mitochondrial and microsomal MAO.  
Biochem. Pharmacol., 36, 15 : 2539-2546.
63. WALLIN H., SCHELIN C., TUNEK A., JERGIL B. (1981)  
A rapid and sensitive method for determination of covalent  
binding of benzo(a)pyrene to proteins.  
Chem. Biol. Interac., 38 : 109-118.
64. LAEMMLI U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during to assembly of the  
head of bacteriophage T4.  
Nature (London), 227 : 680-685.
65. TOWBIN H.T., STAEBLIN T., GORDON J. (1979)  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid  
gel on to nitrocellulose sheets : procedure and some  
applications.  
Proc. Natl; Acad. Sci., USA, 76 : 4350-4354.
66. HSU S.M., SOBAN E. (1982)  
Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation  
by metallic ions and its application for double immuno-  
chemistry.  
J. Histochem. Cytochem., 30 : 1079-1082.
67. ERLANGER B.F., BOREK F., BEISER S.M., LIEBERMAN S. (1957)  
Steroid protein-conjugates.  
J. Biol. Chem., 228 : 713- 727.

68. SEGLEN P.O. (1976)  
Preparation of isolated rat liver cells.  
Methods in cell biology, Ed. Prescott, 13, pp. 29-83.
69. WOLF R.C., SEILMAN S., OESCH F., MAYER R.T., BURKE M.D.  
(1986)  
Multiple forms of cytochrome P-450 related to forms induced marginally by phenobarbital.  
Biochem. J., 240 : 27-33.
70. BEAUNE P., DANSETTE P.M., MANSUY D., KIFFEL L., AMAR C., LEROUX J.P., HOMBERG J.C. (1988)  
Autoantibodies anticytochrome P-450 during autoimmune hepatitis.  
Liver cells and drugs Ed. A. Guillouzo Coll. INSERM, 164, pp. 175-180.
71. WAXMAN D.J., LAPENSON D.P., KRISHNAN M., BERNARD O., KREIBICH G., ALVAREZ F. (1988)  
Antibodies to LKM1 in CAH recognize specific forms of hepatic cytochrome P-450.  
Gastroenterology, 95 : 1326-1331.
72. BAINS S.T., GARDINER S.M., MANNWEILER K., GILLET D., GILSON G.G. (1985)  
Immunochemical study of the contribution of hypolipidaemic induced cytochrome P-452 to the metabolism of lauric acid and arachidonic acid.  
Biochem. Pharmacol., 34, 18 : 3221-3229.
73. NEAU E. (1986)  
Hydroxylation métabolique in vitro des acyl-2-thiophènes.  
D.E.A. de Pharmacochimie moléculaire, Pharmacologie expérimentale et Métabolisme.
74. NEAU E. (1989)  
Thèse de Doctorat en Pharmacochimie (manuscrit en préparation)
75. GONZALEZ F.J. (1989)  
The molecular biology of cytochrome P-450s.  
Pharmacol. Rev., 40, 4 : 243-288.

76. GUEGUEN M., MEUNIER-ROTIVAL M., BERNARD O., ALVAREZ F. (1988)  
Anti-LKM antibody recognizes a cytochrome P-450 from  
the IID subfamily.  
J. Exp. Med., 168 : 801-806.
77. KIFFEL L., LOEPER J., HOMBERG J.C., LEROUX J.P. (1989)  
A human cytochrome P-450 is recognized by anti-LKM  
antibodies in autoimmune chronic hepatitis.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 159, 1 : 283-289.
78. ZANGER U.M., HAURI H.P., LOEPER J., HOMBERG J.C., MEYER U.A.  
(1988)  
Antibodies against human cytochrome P-450 db1 in autoimmune  
hepatitis type II.  
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85 : 8256-8260.
79. SATOH H., MARTIN B.M., SCHULICK A.H., CHRIST D.D., KENNA J.G.,  
POHL L.R. (1989)  
Human anti-endoplasmic reticulum antibodies in sera of  
patients with halothane-induced hepatitis are directed  
against a trifluoroacetylated carboxylesterase.  
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86 : 322-326.
80. HOPF U., MEYER zum BUSCHENFELDE K.H., ARNOLD W. (1976)  
Détection of a liver-membrane autoantibody in HBsAg-  
negative CAH.  
N. Engl. J. Med., 294 : 578-582.
81. GERKEN G., MANNS M., RAMADORI G., PORALLA T., DIENES H.P.  
MEYER zum BUSCHENFELDE K.H. (1987)  
Liver membrane autoantibodies in CAH.  
J. Hepatology, 5 : 65-74.
82. PRYZWANSKI K.B. (1982)  
Applications of double-label immunofluorescence.  
Techniques in immunochemistry. Ed. Bullock G.R. and  
Petruz P. Acad. Press., 1, pp.83-89.

83. HOPF U., MEYER zum BUSCHENFELDE K.H., FREUNDENBERG J. (1974)  
Localisation of a membrane antigen at cell surface of  
isolated hepatocytes.  
Clin. Exp. Immunol., 16 : 117-123.
84. SATOH H., DAVIES H.W., TAKEMURA T., GILLETTE J.R., MAEDA K.,  
POHL L.R. (1987).  
An immunochemical approach to investigating the mechanism  
of halothane-induced hepatotoxicity.  
Progress in drug metabolism, Ed. Bridges J.W.,  
Chasseaud L.F. and Gibson G.G., Taylor and Francis, 10, pp. 187-206
85. STASIECKI P., OESCH F. (1980)  
Distribution of enzymes involved in metabolism of polycyclic  
aromatic hydrocarbons among rat liver endomembranes and  
plasma membranes.  
Eur. J. Cell. Biol., 21 : 79-92.
86. ANTOINE M., SIEST G., FOURNEL S., VISVIKIS A., WELLMAN-  
BEDNAWSKA M. (1987)  
Subcellular localisation of drug metabolizing enzymes in  
relation to their function.  
Drug Metabolism from molecules to man. Ed. Benford D.,  
Bridges J., Gibson G.G., Taylor and Francis, pp. 135-150.
87. OESCH F., BENTLEY P., GOLAN M., STASIECKI P. (1985)  
Metabolism of benzo(a)pyrene by subcellular fractions of  
rat liver : evidence for similar patterns of cytochrome  
P-450 in rough and smooth endoplasmic reticulum but not  
in nuclei and plasma membrane.  
Cancer Res., 45 : 4838-4843.
88. AMAR C., DANSETTE P.M., GIRAULT J.P., MANSUY D.  
Manuscrit en préparation.
89. LAZAROW P., De DUVE C. (1976)  
A fatty acyl-CoA oxydizing system in rat liver peroxisomes  
enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug.  
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 73 : 2043-2046.

90. YAMAMOTO A., MASAKI R., TASHIRO Y. (1985)  
Is cytochrome P-450 transported from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in rat hepatocytes ?  
J. Cell Biol., 101 : 1733-1740.
91. De LEMOS-CHIARANDINI C., FREY A.B., SABATINI D.D.,  
KREIBICH G. (1987)  
Determination of the membrane topology of the PB-inducible rat liver cytochrome P-450 isoenzyme PB-4 using site-specific antibodies.  
J. Cell Biol., 104 : 209-219.
92. BROWN C., BLACK S. (1989)  
Membrane topology of mammalian cytochromes P-450 from liver endoplasmic reticulum.  
J. Biol. Chem., 264, 8 : 4442-4449.
93. ZIMMERMAN H.J., ISHAK K.G. (1987)  
The hepatic injury of MAO inhibitors.  
J. Clin. Psychopharmacol., 7, 4 : 211-213.
94. DANAN G., HOMBERG J.C., BERNUAU J., ROCHE-SICOT J.,  
PESSAYRE D. (1983)  
Hépatite à l'iproniazide. Intérêt diagnostique d'un nouvel anticorps anti-mitochondrial, l'anti-M6.  
Gastroenterol. Clin. biol., 7 : 529-532.
95. SMITH T.E., WEISSBACH H., UNDEFRIEND S. (1963)  
Studies on MAO : the mechanism of inhibition of MAO by iproniazid.  
Biochemistry, 2 : 746-751.
96. BACH A.W., LAN N.C., JOHNSON D.L., ABELL C.W., BEMBENEK M.E.,  
KWAN S.W., SEEBURG P.H., SHIH J.C. (1988)  
cDNA cloning of human liver MAO A and B : molecular basis of differences in enzymatic properties.  
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85 : 4934-4938.

97. TIPTON K.F. (1980)  
Monoamine oxydase.  
Enzymatic basis of detoxication. Ed. Jacoby D.W.,  
Academic Press, 1, pp. 355-370. .
98. GLOVER V., SANDLER M. (1986)  
Clinical Chemistry of MAO.  
Cell Biochemistry and function, 4 : 89-97.
99. SINGER T.P. (1985)  
Mitochondrial monoamine oxydase.  
Biochemical Pharmacology and Toxicology. Ed. D.Zakins and  
D.A. Vessey, 1, pp. 229-263.
100. CHEN S., WEYLER W. (1988)  
Partial amino acid sequence analysis of human placenta  
MAO A and bovine liver MAO B.  
Biochem. Biophys. Res. Com., 156, 1 : 445-450.
101. NELSON S., MITCHELL J., SNODGRASS W., TIMBRELL J. (1978)  
Hepatotoxicity and metabolism of iproniazid and isopro-  
pylhydrazine.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 206, 1 : 574-585.
102. GOMEZ N., UNZETA M., TIPTON K., ANDERSON M., O'CARROLL A.M.  
(1986)  
Determination of MAO concentrations in rat liver by  
inhibitor binding.  
Biochem. Pharmacol., 35, 24 : 4467-4472.
103. GOMEZ N., BALSAS D., UNZETA M. (1988)  
A comparative study of some kinetic and molecular  
properties of microsomal and mitochondrial MAO.  
Biochem. Pharmacol., 37, 18 : 3407-3413.
104. STROLIN-BENEDETTI M., DOSTERT P., TIPTON K. (1989)  
Contributions of MAO to the metabolism of xenobiotics.  
Progress in drug metabolism, Ed. Gibson G.G., Taylor and Francis  
11, pp.150-174.

105. DENNICK R.G., MAYER J. (1977)  
Purification and immunochemical characterization of MAO  
from rat and human liver.  
Biochem. J., 161: 167-174.
106. BILLETT E., GUNN B., MAYER J. (1984)  
Characterization of two monoclonal antibodies obtained  
after immunization with human liver mitochondrial membrane  
preparations.  
Biochem. J., 221 : 765-776.
107. RUSSELL S.M.; DAVEY J., MAYER R.J. (1979)  
The vectorial orientation of human MAO in the mitochondrial  
outer membrane.  
Biochem. J., 181 : 7-14.
108. RUSSELL S.M., MAYER R.J. (1983)  
Degradation of transplanted rat liver mitochondrial  
outer membrane proteins in hepatoma cells.  
Biochem. J., 216 : 163-175.
109. JACOB L., LETY M.A., BACH J.F., LOUVARD D. (1986)  
Human systemic lupus erythematosus sera contain antibodies  
against cell-surface proteins that share epitope with DNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 6970-6974.
110. FUJINAMI R.S., OLDSTONE M.B. (1989)  
Molecular mimicry as a mechanism for virus-induced  
autoimmunity.  
Immunol. Res., 8, 3-15.
111. UETRECHT J.P. (1988)  
Mechanism of drug-induced lupus.  
Chem. Res. Toxicol., 1, 3 : 133-143.
112. BACH J.F. (1987)  
Les mécanismes de l'autoimmunité.  
C.R. Soc. Biol., 181, 5-10.

LISTE DES FIGURES

=====

CHAPITRE I

Figure 1	Hypothèse de formation d'un haptène dans les réactions d'hypersensibilité induite par des médicaments.....	3
Figure 2	Mécanismes immunitaires dans l'hépatotoxicité médicamenteuse de type immuno-allergique ....	5
Figure 3	Réaction de détoxication.....	6
Figure 4	Protoporphyrine IX de fer.....	8
Figure 5	Représentation schématique du cytochrome P-450.....	8
Figure 6	Transport d'électrons du NADPH au cytochrome P-450.....	9
Figure 7	Inducteurs classiques des cytochromes P-450 chez l'animal de laboratoire.....	12
Figure 8	Mécanismes conduisant à la formation de métabolites réactifs.....	21
Figure 9	Test d'immunofluorescence indirecte.....	25
Figure 10	Métabolisme de l'halothane.....	31
Figure 11	Métabolisme de l'acide tiénilique.....	32
Figure 12	Mécanisme postulé pour l'apparition d'anticorps anti-LKM2.....	35

CHAPITRE III

Figure 13	Migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide de protéines microsomales de différents foies humains.....	62
Figure 14	Migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide de protéines microsomales hépatiques de rats traités par différents inducteurs.....	63
Figure 15	Migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide de cytochromes P-450 purifiés de foie de rat.....	65
Figure 16	Reconnaissance par immuno-transfert de microsomes hépatiques de rat par un anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A de rat.....	67

Figure 17	Reconnaissance par immuno-transfert de cytochromes P-450 purifiés de foie de rat par un anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A de rat.....	68
Figure 18	Reconnaissance par immuno-transfert de microsomes de foie humain par des anticorps anti-LKM2 ou anti-cytochrome P-450-UT-A de rat...	70
Figure 19	Reconnaissance par immuno-transfert de microsomes hépatiques de rat par un anticorps anti-LKM2.....	72
Figure 20	Reconnaissance par immuno-transfert de cytochromes P-450 purifiés de foie de rat par un anticorps anti-LKM2 .....	75
Figure 21	Activation métabolique de l'acide tiénilique ou du CRE 4316.....	79
Figure 22	Taux de fixation covalente de métabolites de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur les protéines microsomales de différents foies humains.....	81
Figure 23	Inhibition de la fixation covalente de métabolites de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur des protéines microsomales de foie humain H97 en présence de sérums contenant des anticorps anti-LKM2.....	83
Figure 24	Inhibition de la fixation covalente de métabolites du CRE 4316 sur des protéines microsomales de différents foies humains en présence de sérums contenant des anticorps anti-LKM2.....	85
Figure 25	Taux de fixation covalente de métabolites de l'acide tiénilique ou du CRE 4316 sur des protéines microsomales hépatiques de rats différemment traités.....	87
Figure 26	Inhibition de la fixation covalente de métabolites du CRE 4316 sur des protéines microsomales hépatiques de rats en présence de sérums contenant des anticorps anti-LKM2....	89
Figure 27	Structure schématique du foie de rat.....	92
Figure 28	Structure d'un lobule rénal.....	93
Figure 29	Structure du rein de rat.....	94

Figure 30	Immunofluorescence indirecte des anticorps anti-LKM2 sur coupes de foie et de rein....	97
Figure 31	Fluorescence indirecte de coupes de foie de rats femelle et foetal en présence d'anticorps anti-LKM2.....	103
Figure 32	Coupe de foie de rat témoin.....	105
Figure 33	Coupe de foie de rat traité par l'acide tiénilique.....	106
Figure 34	Coupe de foie de rat traité par le clofibrate.....	107
Figure 35	Coupe de foie de rat traité par le clofibrate puis l'acide tiénilique.....	109
Figure 36	Homologie de séquence entre cytochromes P-450 humains de la famille méphénytoïne (IIC8 et IIC10).....	117
Figure 37	Homologie de séquence entre cytochrome P-450 humain (IIC10) et cytochrome P-450-UT-A (IIC11) de foie de rat.....	118

#### CHAPITRE IV

Figure 38	Cavité abdominale du rat.....	122
Figure 39	Immunofluorescence indirecte des anticorps anti-LKM2 sur hépatocytes de rats traités par le clofibrate puis par l'acide tiénilique : comparaison des résultats obtenus avec des hépatocytes fixés ou non.....	123
Figure 40	Principe de la détection des antigènes de surface hépatocytaire par immunofluorescence indirecte.....	124
Figure 41	Immunofluorescence indirecte obtenue par interaction d'un sérum contenant des anticorps anti-LKM2 (KUT) avec des hépatocytes isolés de rats différemment traités.....	130
Figure 42	Immunofluorescence indirecte obtenue par interaction d'anticorps anti-cytochrome P-450-UT-A avec des hépatocytes isolés de rats témoins ou traités.....	133

Figure 43	Couplage de l'acide tiénilique à une protéine porteuse.....	137
Figure 44	Test en ELISA de la présence d'anticorps anti-acide tiénilique dans le sérum de lapins immunisés par BSA-AT ou CAS-AT.....	139
Figure 45	Structure des produits utilisés lors de l'inhibition de la reconnaissance en test ELISA de sérums de lapins immunisés par BSA-AT ou CAS-AT.....	140
Figure 46	Inhibition par différents produits de la reconnaissance en test ELISA de sérums de lapins immunisés par BSA-AT ou CAS-AT.....	142
CHAPITRE V		
Figure 47	Réaction d'oxydation de substrats par les monoamine oxydases.....	149
Figure 48	Oxydation de la tyramine par les monoamine oxydases.....	150
Figure 49	Structure proposée pour les adduits formés sur la FAD par réaction de certains inhibiteurs irréversibles des monoamine oxydases.....	152
Figure 50	Structure de certains inhibiteurs irréversibles des monoamine oxydases.....	152
Figure 51	Métabolisme de l'iproniazide.....	153
Figure 52	Profil électrophorétique de protéines mitochondriales de foie et de placenta humains	154
Figure 53	Fluorographie de protéines mitochondriales marquées à la pargyline tritiée.....	155
Figure 54	Principe de l'immunoprécipitation de protéines mitochondriales (MAO) par les anticorps anti-M6.....	156
Figure 55	Immunoprécipitation des monoamine oxydases de foie humain par les anticorps anti-M6 : effet de la quantité de protéines mitochondriales.....	158
Figure 56	Immunoprécipitation des monoamine oxydases de foie humain par les anticorps anti-M6.....	160
Figure 57	Immunoprécipitation des monoamine oxydases de foie humain par les anticorps anti-M6 : effet de la quantité de sérum.....	161

Figure 58	Immunoprécipitation des monoamine oxydases A ou B de foie humain par les anticorps anti-M6.....	164
Figure 59	Interaction de la monoamine oxydase de placenta humain avec les anticorps anti-M6.	166
Figure 60	Immunoprécipitation de la monoamine oxydase de foie humain par les anticorps anti-M6 : mesure de l'activité enzymatique résiduelle dans le surnageant.....	168
Figure 61	Reconnaissance par immuno-transfert de protéines mitochondriales de foie humain par des anticorps anti-M6.....	170

LISTE DES TABLEAUX

=====

CHAPITRE I

Tableau 1	Nomenclature des cytochromes P-450 hépatiques de rat.....	14
Tableau 2	Spécificité, inductibilité et activité oxydante de cytochromes P-450 hépatiques de rat.....	15
Tableau 3	Différents cytochromes P-450 de foie humain : nomenclature et substrats caractéristiques...	17
Tableau 4	Homologies entre cytochromes P-450 de foie humain et de rat.....	19
Tableau 5	Médicaments hépatotoxiques connus pour être transformés en métabolites réactifs.....	21
Tableau 6	Macromolécules cibles des métabolites réactifs issus de différents composés.....	23
Tableau 7	Profil de reconnaissance en immunofluorescence indirecte d'anticorps anti-tissus sur différentes coupes d'organes.....	26

CHAPITRE III

Tableau 8	Quantification immunologique des diverses apoprotéines des cytochromes P-450 dans des microsomes hépatiques de rats mâles Sprague Dawley traités par différents inducteurs....	73
Tableau 9	Reconnaissance par immuno-transfert de protéines microsomales hépatiques par des anticorps anti-LKM2 ou anti-cytochrome P-450-UT-A de rat.....	77
Tableau 10	Profil de reconnaissance en immunofluorescence indirecte d'organes de rat et de souris par les anticorps anti-LKM.....	95
Tableau 11	Titration en immunofluorescence indirecte d'un sérum contenant des anticorps anti-LKM2 sur coupes d'organes de rat non traité.....	98
Tableau 12	Effet de l'induction des rats sur la reconnaissance(en immunofluorescence indirecte) de coupes de foie de rats par des anticorps anti-LKM2.....	100

Tableau 13	Comparaison (en immunofluorescence indirecte) de la reconnaissance par les anticorps anti-LKM2 de coupes de foie de rats différemment traités.....	101
Tableau 14	Observations histologiques sur le foie et le rein de rats traités.....	110
Tableau 15	Comparaison des profils de reconnaissance (en immunofluorescence indirecte) sur coupes d'organes des anticorps anti-LKM et d'anticorps anti-cytochromes P-450 hépatiques de rat	111

#### CHAPITRE IV

Tableau 16	Reconnaissance (en immunofluorescence) par les anticorps anti-LKM2 d'hépatocytes de rats différemment traités.....	127
Tableau 17	Reconnaissance (en immunofluorescence) par les anticorps anti-LKM2 d'hépatocytes de rats induits puis traités par l'acide tiénilique ou son isomère.....	128
Tableau 18	Tableau récapitulatif de la reconnaissance (en immunofluorescence) par les anticorps anti-LKM2 d'hépatocytes de rats différemment traités.....	131
Tableau 19	Intensité de fluorescence observée lors de la reconnaissance d'hépatocytes de rats par des anticorps anti-cytochrome P-450 de rat.....	134
Tableau 20	Tableau récapitulatif de la reconnaissance (en immunofluorescence indirecte) par des anticorps anti-cytochromes P-450 d'hépatocytes isolés de rats différemment traités.....	135

#### CHAPITRE V

Tableau 21	Quelques propriétés des monoamine oxydases A et B.....	148
------------	--	-----