HAL
open science

Préparation d'anticorps anti-acide tiénilique chez le lapin et recherche d'anticorps anti-médicaments dans le serum de patients atteints d'hépatite autoimmune secondaire à la prise d'acide tiénilique

Philippe Valadon

To cite this version:

Philippe Valadon. Préparation d'anticorps anti-acide tiénilique chez le lapin et recherche d'anticorps anti-médicaments dans le serum de patients atteints d'hépatite autoimmune secondaire à la prise d'acide tiénilique. Toxicologie. Université Paris 5 Necker enfants malades, 1992. Français. NNT : . tel-00654072

HAL Id: tel-00654072

https://theses.hal.science/tel-00654072v1

Submitted on 20 Dec 2011

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.

ACADEMIE de PARIS
UNIVERSITE RENE DESCARTES

FACULTE DE MEDECINE
NECKER - ENFANTS - MALADES

Année 1992 **THESE** N° __

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

VALADON Philippe, né le 15 février 1960

Présentée et soutenue publiquement le 6 Octobre 1992

PREPARATION D'ANTICORPS ANTI-ACIDE TIENILIQUE CHEZ LE LAPIN et RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI-MEDICAMENT DANS LE SERUM DE PATIENTS ATTEINTS D'HEPATITE AUTOIMMUNE SECONDAIRE A LA PRISE D'ACIDE TIENILIQUE.

Président : Mr Jean Paul LEROUX, Professeur

ACADEMIE de PARIS
UNIVERSITE RENE DESCARTES

FACULTE DE MEDECINE
NECKER - ENFANTS - MALADES

Année 1992 **THESE** N° __

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

VALADON Philippe, né le 15 février 1960

Présentée et soutenue publiquement le 6 Octobre 1992

PREPARATION D'ANTICORPS ANTI-ACIDE TIENILIQUE CHEZ LE LAPIN et RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI-MEDICAMENT DANS LE SERUM DE PATIENTS ATTEINTS D'HEPATITE AUTOIMMUNE SECONDAIRE A LA PRISE D'ACIDE TIENILIQUE.

Président : Mr Jean Paul LEROUX, Professeur

A Monsieur le Professeur Jean-Claude CHOTTARD

Que Monsieur le Professeur Jean-Paul LEROUX trouve ici l'expression de ma plus vive reconnaissance pour avoir accepter de présider ce travail.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (CNRS URA 400) de Monsieur Daniel MANSUY.

Qu'il soit ici remercié pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je voudrais lui exprimer ma profonde reconnaissance pour la confiance qu'il a toujours su me prodiguer tout au long de ces années. C'est dans la rigueur et la précision de la pensée que je lui dois le meilleur de ses enseignements.

Sans Monsieur Patrick DANSETTE, ce travail ne pourrait exister !
Avec sa constante disponibilité, son savoir sans limite, ses idées sans cesse renouvelées, il m'a guidé tout au long de cette approche. Je lui dois l'essentiel, qu'il en soit remercié !

Je remercie également Monsieur le Professeur Pierre KAMOUN qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

Je remercie Maryse Jaouen pour son aide précieuse et les connaissances quelle m'a apportées ainsi que Eric Bonierbale qui a effectué la réalisation expérimentale de la troisième partie. Je n'oublierais pas non plus l'ensemble des membres de l'"URA" pour leur aide et ces nombreuses années passées ensemble.

RESUME

L'acide tiénilique (AT) est un diurétique responsable d'hépatites autoimmunes où les autoanticorps appelés anti-LKM2 sont dirigés contre les cytochromes P-450, justement responsables de la métabolisation de l'AT. Cette hépatite constitue un modèle d'étude des maladies autoimmunes spécifiques d'organes où les antigènes sont souvent des enzymes et pour lesquelles des facteurs étiologiques environnementaux ont été suggérés.

Afin d'étudier les néoantigènes formés par alkylation des protéines au cours de sa métabolisation, nous avons fixé l'AT à la sérumalbumine de bœuf. La protéine obtenue (BSA-AT) est immunogène chez le lapin et les anticorps obtenus (anticorps anti-AT) reconnaissent by Elisa les métabolites de l'AT fixés aux protéines. Ces anticorps sont en cours de développement.

Au moyen de la BSA-AT, nous avons recherché la présence d'anticorps anti-médicament dans les sérums de patients atteints d'hépatite. Les résultats préliminaires sont en faveur de la présence de ces anticorps dans les sérums de tous les patients prenant de l'AT.

SUMMARY

Tienilic acid (TA) is a diuretic drug responsible for autoimmune hepatitis in a few subjects. The sera of patients contain autoantibodies called anti-LKM2 wich recognize cytochromes P450's. These P450's also catalyze the metabolic activation of TA.

We describe the haptenization of bovine serumalbumin with TA (BSA-AT). This protein injected to rabbits produce the formation of antibodies (anti-TA) which recognize TA metabolites bound to microsomal proteins as shown by Elisa. These antibodies should be an efficient tool to investigate covalent binding of TA.

With BSA-AT and by Elisa, we have looked for the possible occurence of antibodies raised against TA in the sera of patients suffering from hepatitis. Our preliminary results show that all the sera of patients treated with TA recognize BSA-AT and that the control sera do not.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I - INTRODUCTION 1

1.1. Maladie autoimmune secondaire à la prise d'acide tiénilique..... 1
1.2. Hépatopathies autoimmunes..... 3
1.3. Anticorps anti-tissus en pathologie hépatique autoimmune..... 5
1.4. Exemples d'hépatopathies autoimmunes..... 6
1.4.1. Hépatite à l'halothane..... 6
1.4.2. HCA autoimmune de type II..... 7
1.4.3. HCA induite par la dihydralazine..... 7
1.5. Le système de détoxification hépatique..... 8
1.6. Rôle des cytochromes P-450 dans la détoxification des substances exogènes..... 11
1.6.1. Définition..... 11
1.6.2. Aspects structuraux d'une monooxygénase à P-450..... 12
1.6.3. Cycle catalytique du cytochrome P-450..... 13
1.6.4. Activation métabolique et cytochromes P-450..... 15
1.6.5. Classification des cytochromes P-450, régulation..... 16
1.7. Métabolisme de l'AT et de ses dérivés..... 16
1.7.1. Toxicité de l'AT et de son isomère *in vivo*..... 16
1.7.2. Métabolisme de l'AT *in vivo* et *in vitro*..... 17
1.7.3. Métabolisme du TAI..... 19
1.8. Hépatite autoimmune induite par l'AT..... 20
1.8.1. Nature des autoanticorps anti-LKM2..... 20
1.8.2. L'hypothèse "d'activation-fixation-externalisation"..... 21
1.8.3. Rôle des néoantigènes..... 23
1.9. Projet de recherche..... 24

CHAPITRE II - COUPLAGE DE L'ACIDE TIENILIQUE A LA SERUMALBUMINE DE BOEUF 26

2.1. Stratégie de couplage..... 26
2.2. Réalisation..... 28

2.3. Résultats..... 29
2.4. Discussion..... 31

CHAPITRE III - IMMUNISATION DE LAPINS PAR LA BSA-AT ET PREPARATION D'ANTICORPS ANTI-AT..... 32

3.1. Protocole d'immunisation..... 32
3.2. Etude de la réponse anti-BSA-AT par double diffusion en gel d'agarose..... 33
3.3. Mise en évidence par test Elisa d'une réponse dirigée contre les métabolites du TAI fixés de façon covalente aux protéines microsomales. 36
3.4. Estimation de l'affinité des anticorps anti-AT pour le TAI..... 38
3.4.1 Principe..... 38
3.4.2. Résultats..... 39
3.5. Préparation de la fraction des immunoglobulines des sérums du lapin meilleur répondeur et mise en évidence d'une réponse anti-AT. 41
3.6. Caractérisation de l'épitope de l'acide tiénilique reconnu par les anticorps anti-AT..... 42
3.6.1. Méthodes..... 42
3.6.2. Résultats..... 44
3.7. Discussion..... 47

CHAPITRE IV - RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI-MEDICAMENT DANS LES SERUMS DE PATIENTS ATTEINTS D'HEPATITE SECONDAIRE A LA PRISE D'AT 52

4.1. Méthodologie..... 52
4.2. Résultats..... 53
4.2.1. Mise en évidence d'une reconnaissance de la BSA-AT par le sérum KUT..... 53
4.2.2. Etude des sérums témoins et des sérums des patients sous AT. 53
4.2.3. Influence de la dialyse des sérums sur le test Elisa..... 57
4.2.4. Inhibition en présence d'AT..... 58
4.3. Discussion..... 58

CHAPITRE VI - CONCLUSION..... 61

CHAPITRE V - PARTIE EXPERIMENTALE..... 64

6.1. Produits chimiques..... 64
6.2. Synthèse de la BSA-AT par la méthode au SPDP..... 64

6.2.1. Thiolation de la BSA..... 64
6.2.2. Couplage avec l'acide 5-chloro-tiénilique **12**..... 66
6.3. Protocole d'immunisation, obtention des sérums et de la fraction des immunoglobulines..... 67
6.3.1. Immunisation..... 67
6.3.2. Réalisation des prélèvements et préparation des sérums.... 67
6.3.4. Obtention de la fraction des immunoglobulines du lapin 2... 68
6.4. Technique de double diffusion sur gel d'agarose (Ouchterlony)..... 68
6.5. Mesure de l'affinité des anticorps par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium..... 69
6.6. Préparation des métabolites du TAI ou de l'AT fixés aux protéines microsomales..... 70
6.6.1. Origine des animaux..... 70
6.6.2. Protocole d'induction au clofibrate..... 70
6.6.3. Préparation de la fraction microsomale de foie de rat..... 71
6.6.4. Réalisation des incubations..... 71
6.7. Tests Elisa..... 74
6.7.1. Protocole des tests Elisa..... 74
6.7.2. Calibrage des tests Elisa..... 74
6.8. Dialyse des sérums..... 77
6.9. Origine et synthèse des inhibiteurs..... 77
6.9.1. Origine des inhibiteurs..... 77
6.9.2. Techniques spectroscopiques..... 78
6.9.3. Synthèse du 2-acétyl, 5-S-mercaptoéthanol-thiophène **19**.... 78
6.9.4. Synthèse de l'acide dihydroéthacrynique **15**..... 79
6.9.5. Synthèse de **17**..... 80

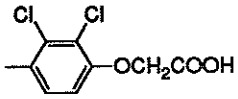
BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS

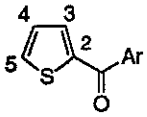
ABTS	acide 2,2'-azino-di(3'-éthyl-benzothiazole sulfonique)
Ac	anticorps
AMA	anticorps anti-mitochondries
ANA	anticorps anti-noyaux
AT	acide tiénilique
BSA	sérumalbumine de bœuf
BSA-AT	BSA substituée par l'AT
BSA-SCH2CONH2	BSA thiolée et bloquée par l'iodoacétamide
CLO	clofibrate
DETAPAC	acide diéthylènetriamine pentaacétique
D.O.	densité optique
DTNB	acide (5,5'-dithiobis)2-nitrobenzoïque
DTT	dithiotréitol
EDTA	éthylènediamine sodique
Elisa	enzyme-linked immunosorbent assay
G6P	glucose-6-phosphate
G6PDH	glucose-6-phosphate déshydrogénase
GSH	glutathion réduit
HCA	hépatite chronique autoimmune
H.P.L.C.	chromatographie en phase liquide sous haute pression
HVS1	Herpès simplex virus de type 1
Ig	immunoglobuline
i.p.	intrapéritonéal
LKM	microsomes de foie et de rein
LM	microsomes de foie
NADH	nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduit)
NADP(H)	nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate oxydé (réduit)
P-450	cytochrome P-450
PB	phénobarbital
PBS	tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM
PEG	polyéthylène glycol
SDS	sodium-dodécyl-sulfate
SLA	anticorps anti-antigènes hépatiques cytoplasmiques
SMA	anticorps anti-muscle lisse
SPDP	N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate
R.M.N.	résonance magnétique nucléaire
TAI	isomère de l'acide tiénilique
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzoparadioxin
Tris	sel de "tris" (Trizma, Sigma)
TAO	triacétate d'oléandomycine
U.V.	ultra-violet

FORMULAIRE

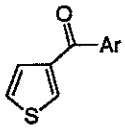
ABREVIATIONS RS = $-SCH_2CH_2OH$ Ar =



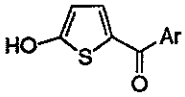
1 (AT)



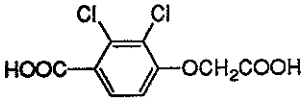
2 (TAI)



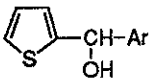
3



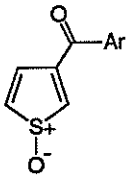
4



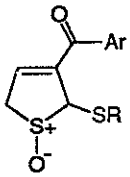
5



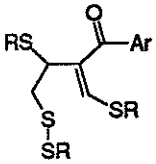
6



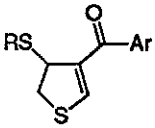
7, 7'



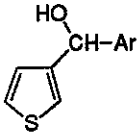
8



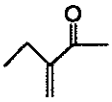
9



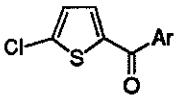
10



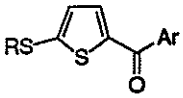
11



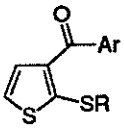
12



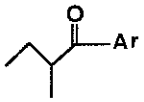
13



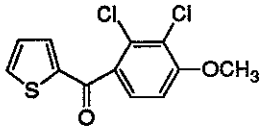
14



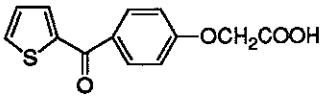
15



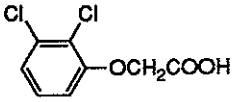
16



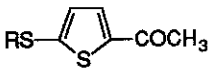
17



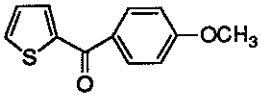
18



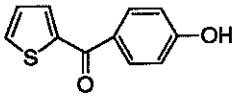
19



20



21



CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. Maladie autoimmune secondaire à la prise d'acide tiénilique.

Un nombre chaque jour croissant d'autoantigènes impliqués dans des maladies autoimmunes spécifiques d'organe sont décrits dans la littérature. Une des hypothèses les plus souvent invoquées pour comprendre l'origine de ces cibles est un "mimétisme moléculaire" qui existerait par homologie de séquences entre les épitopes reconnus par les autoanticorps et des épitopes de protéines bactériennes ou virales [1]. Parmi ces autoantigènes, un nombre remarquablement élevé sont des enzymes [2] comme le cytochrome IID6 dans l'hépatite autoimmune de type II ou la glutamate décarboxylase dans le diabète insulino-dépendant de type I (tableau 1). Cette observation suggère l'intervention d'autres facteurs dans la genèse des maladies autoimmunes spécifiques d'organes. Ainsi, une hypothèse complémentaire pourrait être une métabolisation par ces enzymes de composés exogènes ou endogènes qui s'accompagnerait d'une modification chimique de l'enzyme faisant apparaître des <u>néoantigènes</u>. Ces néoantigènes seraient un des points de départ de la réaction autoimmune [3]. Illustrant cette hypothèse, plusieurs maladies autoimmunes secondaires à la prise d'un médicament possèdent des autoanticorps dirigés contre l'enzyme qui métabolise le médicament (voir ci-dessous). C'est dans ce contexte que nous devons situer notre travail au laboratoire sur les hépatites autoimmunes induites par

Tableau 1 Exemples d'enzymes reconnues comme antigènes impliqués dans des maladies autoimmunes spécifiques d'organe [2, 4 et 5].

Enzyme	maladie
Carboxypeptidase H	diabète de type I
Glutamate décarboxylase	diabète de type I
Cytochrome P-450 IID6	hépatite autoimmune de type II
Peroxydase thyroïdienne	thyroïdite autoimmune
H^+, K^+ ATPase gastrique	gastrite autoimmune
Myéloperoxydase	glomérulonéphrite et vascularite
Protéinase élastolytique	granulomatose de Wegener avec anticorps anti-neutrophiles
Stéroïde 17α-hydroxylase	maladie d'Addison
Pyruvate déhydrogènase	cirrhose biliaire primitive

l'acide tiénilique (AT, **1**), l'organe cible est ici le foie.

Peu après son introduction sur le marché en 1976 par les laboratoires ANPHAR-ROLLAND en tant que diurétique, l'AT ou DIFLUREX a été rapidement mis en cause dans la survenue d'hépatites autoimmunes (1 cas sur 10000) parfois mortelles. Cette complication comportait tous les critères d'une maladie autoimmune secondaire à la prise d'un médicament, à savoir une fréquence de survenue faible, une période de sensibilisation, une absence de relation effet-dose et une réapparition des symptômes en cas de réintroduction accidentelle (rechute rapide et plus intense de l'hépatite).

Ces hépatites donnent le tableau clinique d'une hépatite chronique active (HCA) dont le profil histologique caractéristique est fait d'infiltrats inflammatoires mononucléés envahissant les lobules avec des lésions de fibrose et de nécrose dans les formes complètes. Dans le sérum des patients on peut mettre en évidence des autoanticorps qui reconnaissent les

membranes du réticulum des cellules de foie et de rein appelés anti-LKM2 pour anti-liver and kidney microsomes [6].

1.2. Hépatopathies autoimmunes.

Les maladies autoimmunes hépatiques se partagent entre les HCA, la cirrhose biliaire primitive et certaines cirrhoses mal caractérisées d'étiologie inconnue. De nombreux médicaments comme l'halothane, l'AT, l'oxyphénisatine, la nirofurantoïne, la papavérine, l'α-méthyldopa, l'iproniazide ou encore la dihydralazine... sont à l'origine de complications hépatiques qui comportent les stigmates d'une maladie autoimmune (tableau 2). Le plus souvent leur expression clinique prend la forme d'une HCA.

Les étiologies des HCA sont virales (virus des hépatites B,C et D), autoimmunes et médicamenteuses [7]. Les HCA autoimmunes (encore appelées idiopathiques) sont classées en trois sous-groupes. D'abord le sous-groupe des HCA autoimmunes de type I décrit en premier par Waldenström [8, 9] sous la forme d'un syndrome associant une hypergammaglobulinémie polyclonale et des infiltrations du parenchyme hépatique atteignant électivement la femme jeune. On note la présence d'autoanticorps circulants, des associations fréquentes avec d'autres maladies autoimmunes et une prévalence accrue des marqueurs d'histocompatibilité HLA B8 et DR3. Le terme d'hépatite lupoïde a été utilisé par la suite grâce à la mise en évidence fréquente d'une sérologie antinucléaire (ANA) chez ce type de patient [10] puis d'une sérologie anti-muscle lisse (SMA) plus spécifique. Le deuxième sous-groupe, contenant les HCA autoimmunes de type II, a été individualisé plus récemment par la présence dans le sérum de certains patients d'autoanticorps dirigés contre les membranes du réticulum

endoplasmique des cellules de foie et de rein (anti-LKM1) et atteignant volontiers l'enfant [11]. Actuellement on individualise un troisième sous-groupe marqué par la présence d'autoanticorps dirigés contre des antigènes hépatiques solubles (SLA) (tableau 2).

Tableau 2 Classification des maladies autoimmunes hépatiques.

Hépatopathie	**anticorps anti-tissus**
Cirrhose biliaire primitive	anti-M2
Hépatites chroniques autoimmunes	
type I	anti-muscle lisse (actine)
	ANA
type II	anti-LKM1
autres	SLA
médicamenteuses	
oxyphénisatine	
α-méthyldopa	
nitrofurantoïne	
acide tiénilique	anti-LKM2 (100%)
halothane	anti-LKM1 (25%)
iproniazide	anti-M6
amineptine	
clométacine	
dihydralazine...	anti-LM
Cirrhoses	

1.3. Anticorps anti-tissus en pathologie hépatique autoimmune.

Les anticorps anti-tissus, nommés ainsi pour leur capacité à reconnaître des sous-structures cellulaires indépendamment de l'organe ou de l'espèce d'origine, ont, dans ces pathologies, une valeur diagnostique toute particulière. Il semble que chaque cadre étiologique soit associé à un profil caractéristique de ces autoanticorps. L'immunofluorescence indirecte sur coupe de tissus de divers organes est la méthode de choix de leur détection [12]. Ainsi on distingue :

- les *anticorps anti-noyaux* (ANA), non spécifiques des affections hépatiques mais souvent présents dans les HCA autoimmunes de type I,

- les *anticorps anti-muscle lisse* (SMA) dans 25% des HCA où ils sont spécifiques quand leur titre est supérieur à 80 et de toutes manières propres aux pathologies hépatiques et souvent associés aux ANA ; la molécule cible serait l'actine [13],

- les *anticorps anti-antigènes hépatiques cytoplasmiques* (anti-SLA) détectés par les techniques radioimmunologiques et définissant le troisième sous-groupe des HCA autoimmunes ; la cytokératine a été proposée comme étant l'antigène endogène reconnu [14],

- les *anticorps antimitochondries* (AMA), de M1 à M9 selon leur profil histologique de reconnaissance ; les anti-M2 sont présents dans la cirrhose biliaire primitive où ils reconnaissent des composants du complexe multienzymatique de la pyruvate déshydrogénase [5] ; l'anti-M6 est spécifique d'un effet secondaire à la prise d'iproniazide et est dirigé contre la monoamine oxydase B [15],

- les *anticorps anti-microsomes de foie et de rein* (anti-LKM) qui sont de trois types : les anti-LKM1 retrouvés dans les HCA autoimmunes de type II et spécifiques du segment P3 du tube contourné proximal du rein, les

anti-LKM2 qui n'ont été détectés que dans les hépatites secondaires à la prise d'acide tiénilique et qui sont dirigés contre les segments P1 et P2, enfin les anti-LKM3 mis en évidence dans certaines hépatites à virus δ. Un nouveau type a été décrit récemment [16]. L'autoantigène est dans les cas connus un cytochrome P-450 (voir ci-dessous),

- les *anticorps anti-microsomes de foie* (anti-LM) sont retrouvés dans les HCA induites par la dihydralazine et encore dirigés contre un cytochrome P-450, le P-450 IA2 [17].

A coté des anticorps anti-tissus, d'autres types d'anticorps peuvent être mis en évidence dans les hépatopathies autoimmunes. Des anticorps anti-médicament sont présents dans certaines étiologies médicamenteuses et dirigés contre le médicament ou un métabolite réactif, voire une protéine hapténisée appelée <u>néoantigène</u>. Des auto-anticorps dirigés contre la membrane des hépatocytes sont fréquemment retrouvés [18]. Les antigènes sont dans ce cas des protéines spécifiques du foie obtenues par fractionnement d'un homogénat cellulaire (anti-LSP) ou des fractions de protéines membranaires hépatiques (anti-LMA) ou encore les membranes elles-mêmes (anti-HMP). Le problème est de savoir si l'autoanticorps est cause ou conséquence de la dysrégulation immunitaire et ce contre quoi il est dirigé. Actuellement, seuls les anticorps anti-microsomes ont été définis avec précision d'où leur valeur dans le diagnostic et la compréhension des maladies autoimmunes hépatiques.

1.4. Exemples d'hépatopathies autoimmunes.

1.4.1. Hépatite à l'halothane

Il s'agit d'une hépatite rare qui présente souvent des lésions histologiques d'HCA apparaissant à la suite d'expositions répétées à l'anesthési-

que (1 cas/30000). Les antigènes ont été identifiés sous la forme de protéines membranaires haptènisées par le groupement trifluoroacétyle issu du métabolisme de l'halothane. Les sérums des patients reconnaissent l'haptène et la séquence protéique sous-jacente. Plusieurs néoantigènes apparaissent systématiquement chez l'animal après une exposition à l'halothane, les protéines correspondant à certains d'entre-eux ont été identifiées comme par exemple l'endoplasmine (100 kDa), une carboxyl-estérase (59 kDa), la disulfure isomérase (57 kDa) et un cytochrome P-450 induit par le phénobarbital (54 kDa). Le mécanisme proposé pour expliquer la formation de ces néoantigènes est une activation métabolique de l'halothane réalisée par les P-450 qui conduirait à une trifluoroacétylation de ces protéines dans le lumen du réticulum où elles sont concentrées avant d'être exportées vers la membrane plasmique [19].

1.4.2. HCA autoimmune de type II.

Les auto-anticorps anti-LKM1 reconnaissent une bande unique à 50 kDa par immunotransfert de protéines microsomales hépatiques qui n'est autre que le cytochrome P-450 IID6 [20, 21, 22]. L'activité de ce P-450 est inhibée par les autoanticorps anti-LKM1 [23]. L'épitope pourrait être unique dans la région 258-270 et reconnu de manière consensuelle par tous les sérums. Une homologie avec la séquence du virus Herpès simplex de type I (HSV1) a été proposée par plusieurs auteurs [24, 25]. Un facteur de l'environnement a aussi été suspecté dans la genèse de ces hépatites [26].

1.4.3. HCA induite par la dihydralazine

Les sérums des patients atteints d'une hépatite secondaire à la prise de dihydralazine reconnaissent et inhibent le P-450 IA2 ; le rôle de ce

cytochrome P-450 dans le métabolisme de la dihydralazine n'est pas formellement démontré [17]. Ce même cytochrome est reconnu par le sérum d'un unique cas rapporté d'HCA autoimmune idiopathique avec une sérologie de type LKM [16, 27].

1.5. Le système de détoxification hépatique.

La plupart des substances exogènes dont font majoritairement partie les médicaments nécessitent l'intervention d'un système multienzymatique de détoxification cellulaire pour être éliminées de l'organisme. Ce métabolisme est présent dans tous les organes mais principalement en des positions stratégiques que sont les poumons, la peau, les intestins, les reins et surtout le foie, organe le plus important quantitativement où se trouve le système de détoxification hépatique (figure 1).

Ce système prend en charge une multitude de molécules les plus souvent hydrophobes et peu fonctionnalisées. Les réactions enzymatiques impliquées dans ces biotransformations sont de deux ordres. Les réactions de transformation sont catalysées par les enzymes de phase I qui agissent sur le composé lui-même réalisant une fonctionnalisation généralement oxydative et les réactions de conjugaison transfèrent un groupement à partir d'un donneur endogène (glutathion, acide glucuronique, aminoacides...) et sont catalysées par les enzymes de la phase II (tableau 3).

Nous nous intéresserons plus particulièrement à la famille des cytochromes P-450 qui joue un rôle central dans les phases de transformation et qui est, en particulier, impliquée dans le métabolisme de l'AT et de ses dérivés.

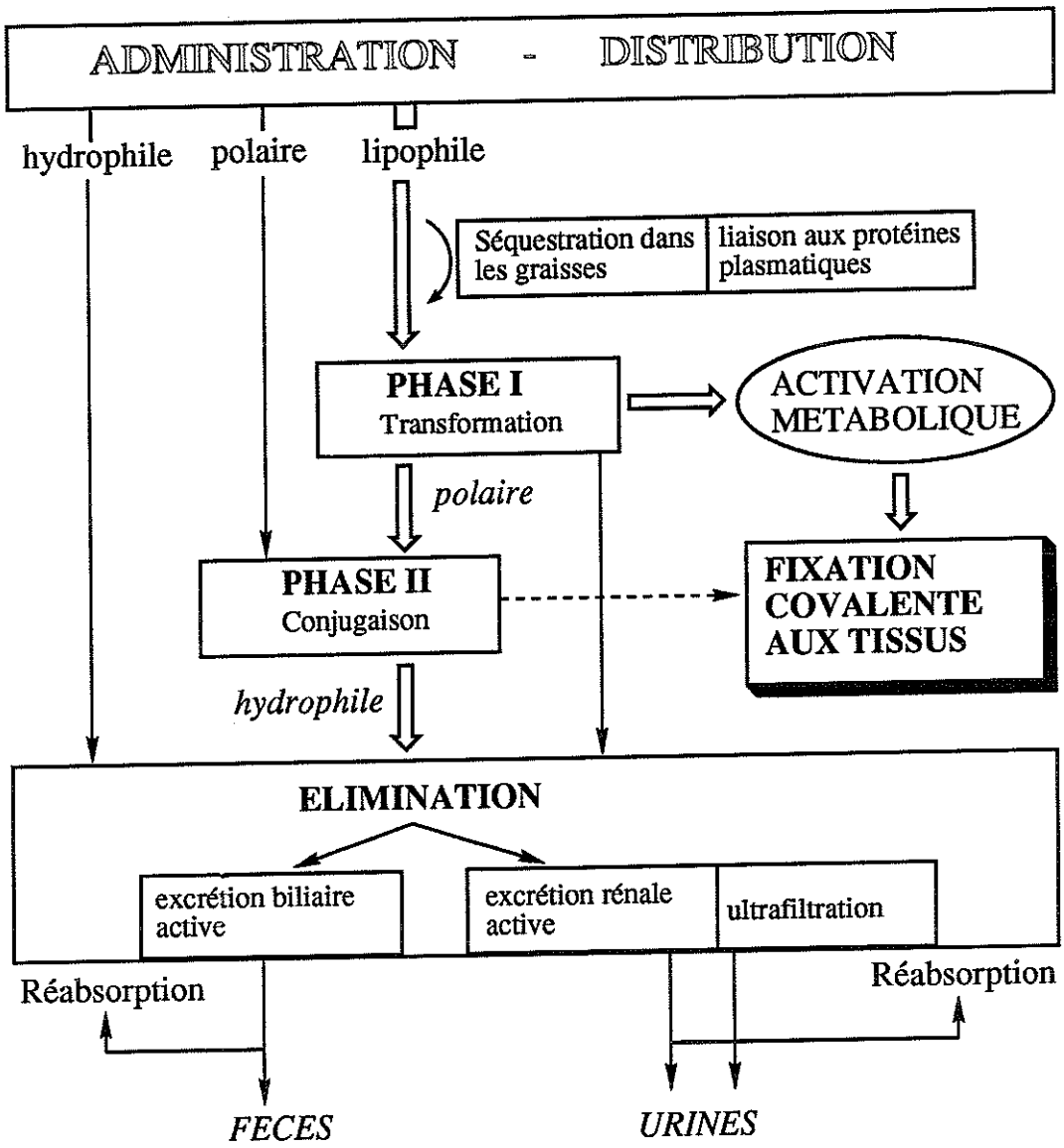


Figure 1 Les différentes phases de l'élimination d'un médicament.

Tableau 3 Principales réactions impliquées dans les biotransformations des xénobiotiques [28].

Réaction	enzymes	localisations	substrats
PHASE I - TRANSFORMATION			
Oxydation	monooxygénases (flavoprotéines, P-450)	microsomes	divers
	monoamines oxydases	mitochondries	amines
	alcools déshydrogénase	cytosol	alcools
	aldéhydes déhydrogénases	cytosol	aldéhydes
Réduction	monooxygénases (cytochromes P-450)	microsomes	divers
	alcools déhydrogénases	cytosol	aldéhydes, cétones
Hydrolyse	estérases	cytosol, microsomes, mitochondries	esters
	hydrolyse d'amides, d'hydrazides, de carbamates ...		
PHASES II - CONJUGAISON			
(avec)			
H_2O	époxyde hydrolase	microsomes, cytosol	époxydes
le glutathion	glutathion transférases	cytosol	électrophiles
l'ac. glucuronique[a)]	glucuronyl transférases	microsomes	NH, OH COOH, SH
l'ac. sulfurique[b)]	sulfotransférases	cytosol	NH, OH
un grpt méthyle[c)]	N- et O-méthyl-transférases	cytosol, microsomes	NH, OH
un grpt acétyle[d)]	N-acétyl transférases	cytosol	NH, OH
un aminoacide			COOH

a) donneur = UDPGA = uridine-3',5'-diphosphoglucuronique acid ; b) PAPS = 3'-phospho-adenosine-5'-phosphosulfate ; c) SAM = S-adenosylmethionine ; d) CoA = coenzyme A.

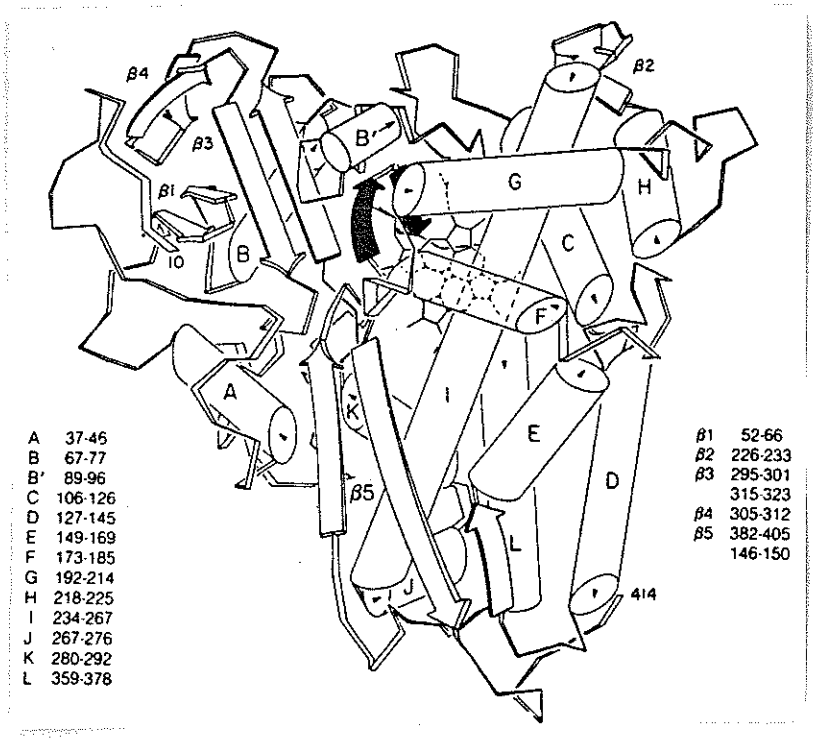


Figure 2 Schématisation du cytochrome P-450 cam (P-450 CI) d'après les données cristallographiques. Les hélices sont représentées par des cylindres et les feuillets β par des flèches ; la région centrale plus foncée contient la cystéine 357, ligand axial de l'hème [30].

1.6. Rôle des cytochromes P-450 dans la détoxification des substances exogènes.

1.6.1. Définition.

Le cytochrome P-450 est un élément d'un complexe enzymatique appelé monooxygénase qui, en présence d'un système donneur d'électrons provenant du NADPH ou du NADH, est capable de transférer un atome d'oxygène de l'oxygène moléculaire sur un substrat R selon la réaction schématisée ci-dessous :

$$R + O_2 + 2e^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{P-450}} RO + H_2O$$

La famille des cytochromes P-450 est largement répandue dans notre organisme et se répartit en deux sous-groupes qui sont les isoenzymes dévolues au métabolisme des substances exogènes et les isoenzymes qui interviennent dans des voies métaboliques endogènes comme dans la biosynthèse et la biodégradation des hormones stéroïdes, des acides gras, des leucotriènes ou des prostaglandines... La spécificité étroite et l'oxydation rapide des substrats des isoenzymes à visée endogène s'opposent à la faible spécificité de substrat et la lenteur réactionnelle des cytochromes P-450 du métabolisme des substances exogènes.

1.6.2. Aspects structuraux d'une monooxygénase à P-450.

Le complexe multienzymatique d'une monooxygénase est composé de:

- une hémoprotéine, le *cytochrome P-450*, au cœur de laquelle l'oxygène moléculaire est activé et réagit avec le substrat,

- une flavoprotéine, la *NADPH-cytochrome P-450-réductase*, qui transfère les électrons du NADPH cytosolique vers les cytochromes P-450 et b5,

- une deuxième flavoprotéine, la *NADPH-cytochrome b5-réductase*, qui transfère les électrons du NADH intraluminal au cytochrome b5,

- une deuxième hémoprotéine, le *cytochrome b5*, qui transfère les électrons vers le P-450,

- enfin des *phospholipides* qui assurent la cohésion de l'ensemble.

Les cytochromes P-450 sont membranaires, enchassés à la face externe du réticulum endoplasmique pour la plupart d'entre eux - notamment ceux intéressés dans le métabolisme des substances exogènes -, mais l'on connaît des formes mitochondriales ou nucléaires ainsi que des formes solubles chez les bactéries. Il n'existe pas encore de cytochrome P-

450 membranaire cristallisé et le modèle le plus ressemblant nous est fourni par le cytochrome P-450 cam, enzyme procaryotique soluble hydroxylant le camphre dont la structure cristalline a été résolue récemment [29] (figure2).

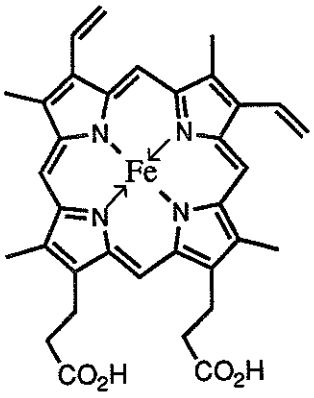


Figure 3 Structure de l'hème.

1.6.3. Cycle catalytique du cytochrome P-450.

Le groupement prosthétique du cytochrome P-450 ou hème est une protoporphyrine IX de fer (figure 3). Au "repos" l'atome de fer est à l'état oxydé Fe^{3+} hexacoordiné. Quatre azotes pyrroliques du cycle porphyrinique lient le fer selon un plan carré, le cinquième ligand est le groupement thiolate d'un résidu cystéinyle situé dans l'axe du plan et le sixième serait soit un groupement hydroxyle de l'apoprotéine soit une molécule d'eau. Cet état du fer dit de spin faible est en équilibre avec un état pentacoordiné de spin fort où le fer est légèrement en dehors du plan. Proche de la poche de l'hème se trouve le site de fixation du substrat ; l'arrivée de celui-ci provoque une transition vers l'état de spin fort dont le potentiel rédox aug-

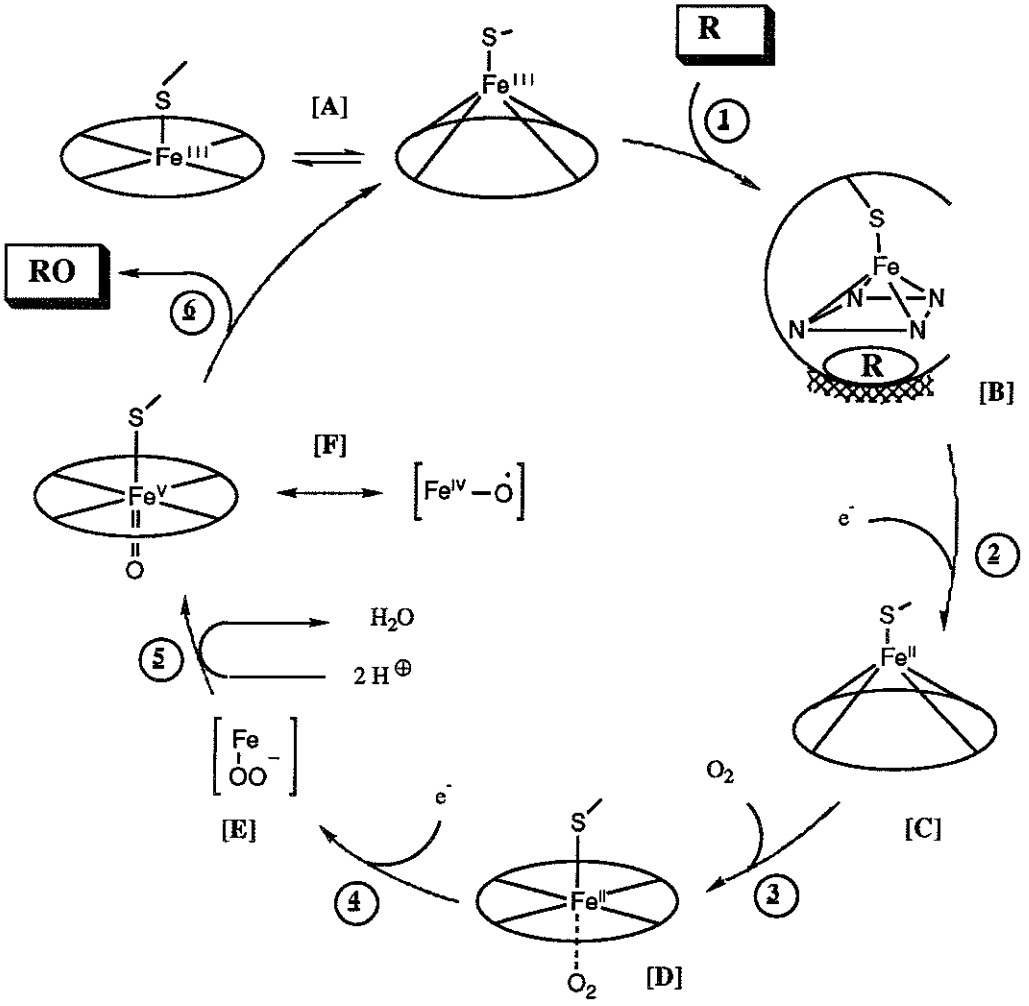


Figure 4 Cycle catalytique du cytochrome P-450. **R** est le substrat, **RO** sa forme oxydée ; la poche de l'hème et le site de fixation du substrat sont schématisés dans le complexe **[B]** [31].

menté d'une centaine de millivolts permet le passage d'un électron provenant du NADPH et l'enclenchement du cycle catalytique (figure 4). Le transfert de l'électron (étape 2) réduit le complexe **[B]** en complexe **[C]** ferreux pentacoordiné. L'arrivée d'une molécule d'oxygène est l'étape 3 qui conduit au complexe ferreux hexacoordiné **[D]**. Le deuxième électron provient soit du NADH via le cytochrome b5, soit du NADPH via la NADPH-cyto-

chrome P-450-réductase et conduit, après élimination d'une molécule d'eau (étapes **4** et **5**), au complexe oxo à oxygène actif très instable **[F]**. Le complexe **[A]** est ensuite régénéré après libération du substrat oxydé **RO** (étape **6**).

Ce cycle, le plus fréquent, constitue la voie oxydante ; trois types de réactions y sont prépondérants : les hydroxylations aliphatiques, les époxydations des doubles liaisons (aromatiques ou non) et les transferts sur un hétéroatome, surtout soufre et azote. D'autres cycles de fonctionnement sont connus, comme par exemple un cycle de réduction, mais sont moins fréquents.

1.6.4. Activation métabolique et cytochromes P-450.

L'activation métabolique est la transformation d'un composé atoxique par une enzyme de l'organisme en un toxique vrai. La production au sein du cytochrome P-450 d'entités réactives mal contrôlées rend compte de la majeure partie des toxicités chimiques par activation métabolique [32]. Le foie est de fait un organe particulièrement exposé à des accidents médicamenteux comme une hépatite aiguë toxique, une hépatite autoimmune, une fibrose, des manifestations de cholestase ou encore un hépatome... [33].

La majorité des entités réactives générées par les cytochromes P-450 sont des composés électrophiles issus du cycle oxydatif et capables de se lier aux groupements nucléophiles des macromolécules endogènes d'où leur appellation "d'agents alkylants".

Le glutathion, γ-glutamyl-L-cystéinylglycine (GSH), grâce à son groupement thiol, nucléophile et réducteur, et sa forte concentration de l'ordre de 5 mM au sein de la cellule hépatique, joue un rôle majeur dans le

contrôle de ces entités. Des thiols comme le mercaptoéthanol ou la N-acétylcystéine sont souvent utilisés *in vitro* pour reproduire le piégeage réalisé *in vivo* par le GSH.

1.6.5. Classification des cytochromes P-450, régulation.

Les cytochromes P-450 sont regroupés au sein d'une superfamille très diversifiée où ils sont classés par homologie de séquence de leur gène en famille (I, II, III...) et sous-famille (IA, IB, IC...) [34, 35]. Chez l'homme, 32 isoenzymes sont connues à ce jour.

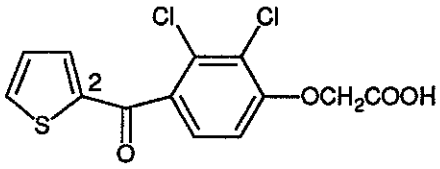
Les mécanismes de régulation de ces enzymes sont nombreux (expression différentielle au cours du développement, selon la nature des tissus, de l'âge...) mais le principal d'entre eux est la capacité pour certaines isoenzymes d'induction par les substances exogènes comme des hydrocarbures aromatiques polycycliques condensés, le phénobarbital, les stéroïdes, les fibrates ou encore l'éthanol. Ce phénomène est à l'origine de nombreuses interactions médicamenteuses.

1.7. Métabolisme de l'AT et de ses dérivés.

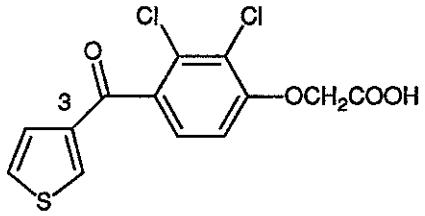
1.7.1. Toxicité de l'AT et de son isomère *in vivo*.

L'AT **1** est un dérivé du noyau thiophène substitué en 2 par un carbonyle (figure 5) qui présente une toxicité directe *in vivo* chez la souris (Dose Létale 50 (DL_{50}) environ de 2100 mg/kg per os chez la souris [36, 37]) ainsi qu'une toxicité indirecte chez l'homme (hépatite autoimmune). L'isomère de l'acide tiénilique en position 3 sur le cycle thiophénique (TAI, **2**, figure 5) est également toxique chez la souris (DL_{50} 900 mg/kg per os) ainsi que chez le rat où il provoque une baisse du glutathion hépatique de 70% au delà de 100 mg TAI/kg per os. Cet isomère est en fait le troisième

exemple de dérivé du thiophène, avec l'AT et le thiophène lui-même [38, 39], connu pour être activé en métabolite électrophile par les cytochromes P-450 au cours de sa biotransformation. On a d'ailleurs proposé l'implication de cet isomère dans la genèse de l'hépatite induite par la prise d'acide tiénilique à cause de sa présence comme impureté à un taux supérieur dans la présentation américaine, pays où l'hépatite a eu une incidence 10 fois plus élevée et entraîné l'arrêt de la commercialisation de l'acide tiénilique.



AT, 1



TAI, 2

Figure 5 Structure de l'AT et de son isomère (TAI).

1.7.2. Métabolisme de l'AT *in vivo* et *in vitro*.

Les différents aspects de ce métabolisme connus à ce jour sont résumés sur la figure 6. La réaction de 5-hydroxylation qui transforme 1 en 3 représente 65% du métabolisme *in vitro* avec des microsomes de foie de

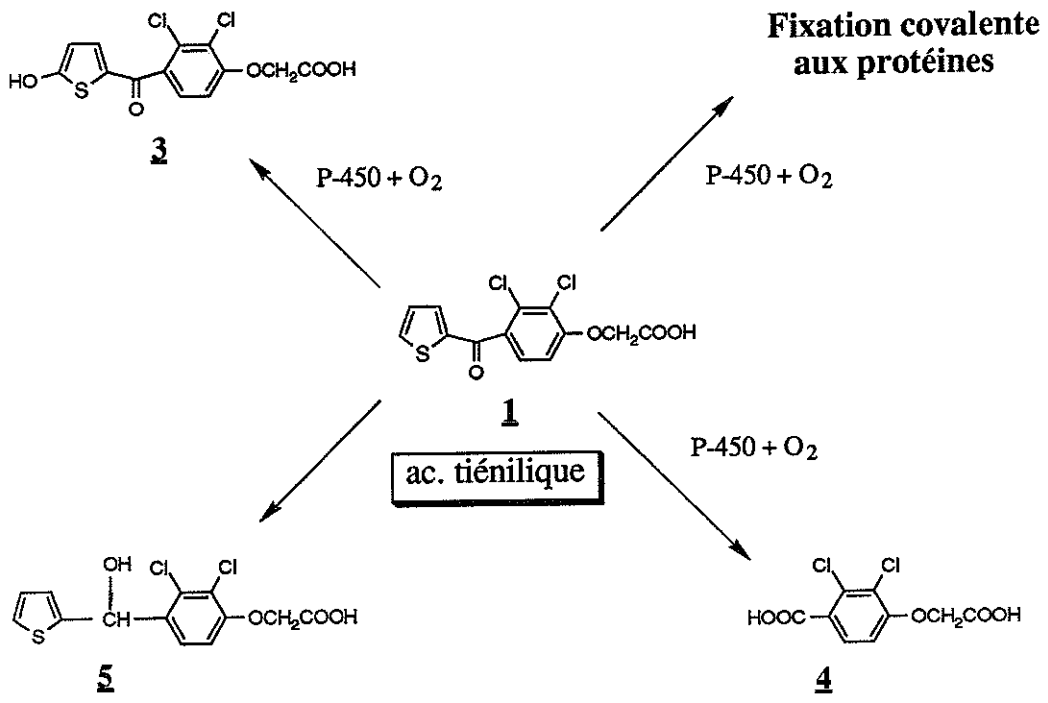


Figure 6 Métabolisme de l'AT.

rat et 45% du métabolisme *in vivo* chez l'homme [40, 41]. La coupure oxydante conduisant au diacide **4** rend compte de 3% du métabolisme total *in vitro* avec des microsomes de foie de rat, de 10% du métabolisme total de différents animaux de laboratoire [42] et de moins de 1% du métabolisme total chez l'homme [41]. Une réaction de fixation covalente aux protéines microsomales a été mise en évidence *in vitro* (30% du métabolisme total en présence de microsomes de foie de rat). Enfin le métabolite **5** de réduction de la cétone, non retrouvé *in vitro* chez le rat, représente 11% des métabolites urinaires excrétés chez l'homme [41] et 80% du métabolisme total chez le chien [42].

Toutes les réactions d'oxydation (formation de **3** et de **4**) ainsi que la réaction de fixation covalente aux protéines de l'AT sont sous la dépendance

des cytochromes P-450. Chez le rat non-induit, le cytochrome P-450 IIC11 est majoritairement responsable de ces activités. Deux nouveaux P-450 métabolisent l'acide tiénilique après traitement des rats par le phénobarbital, ce sont les P-450 IIB1 et IIB2. Ces activités sont également fortement induites chez le rat par le clofibrate sans que le ou les P-450 impliqués aient été identifiés [43]. Chez l'homme, la métabolisation de l'AT est sous la dépendance des cytochromes de la famille IIC qui contient au moins 7 gènes associés au polymorphisme d'hydroxylation de la méphénytoïne. Le cytochrome P-450 IIC9 est pour l'instant la seule isoenzyme de la sous-famille IIC dont l'implication dans ces réactions ait été démontrée [44].

1.7.3. Métabolisme du TAI.

Ce sont les même cytochromes P-450 qui métabolisent l'AT et le TAI. La réaction catalysée dans le cas du TAI est une S-oxydation en sulfoxyde de TAI **6** [44] (figure 7). *In vitro* avec des microsomes de foie de rat, ce composé est extrêmement réactif et va se fixer majoritairement sur les thiols des protéines de façon covalente. En présence d'un thiol comme le mercaptoéthanol ou la N-acétylcystéine dans le milieu réactionnel, ce sulfoxyde est piégé sous forme de deux sulfoxydes de dihydrothiophène **7** et **7'** qui peuvent évoluer à leur tour, sous l'action d'un excès du thiol, en composé **8** puis **9** (figure 7). *In vivo* chez le rat un métabolisme similaire impliquant le GSH a pu être caractérisé [44]. *In vitro* chez l'homme, deux voies métaboliques ont pu être mises en évidence [45]. Un métabolisme oxydatif, catalysé par les cytochromes de la sous-famille IIC, conduit au sulfoxyde de TAI **6** et un métabolisme réductif, ne faisant pas intervenir les P-450, conduit au produit de réduction de la fonction cétone **10** (figure 7).

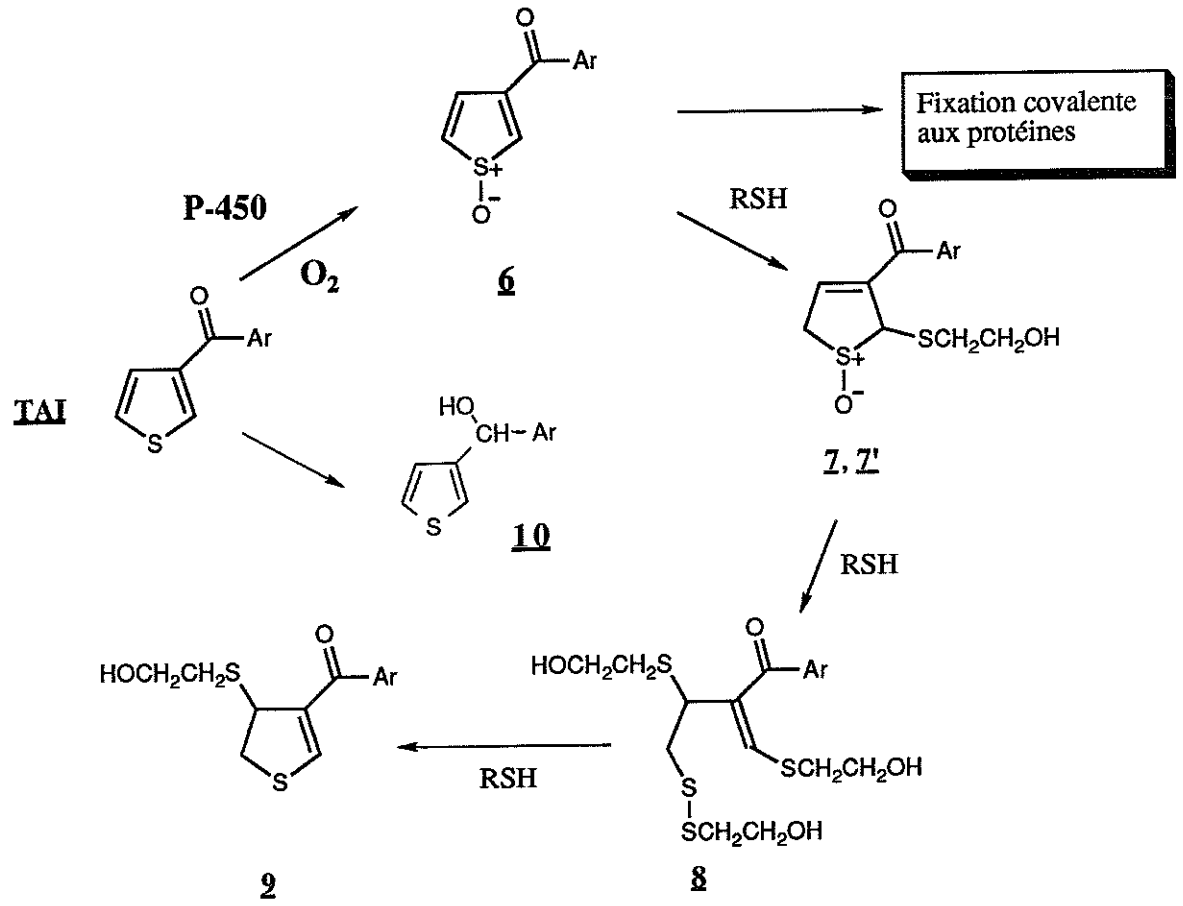


Figure 7 Métabolisme du TAI.

1.8. Hépatite autoimmune induite par l'AT.

1.8.1. Nature des autoanticorps anti-LKM2.

L'étude rétrospective des autoanticorps retrouvés dans les maladies hépatiques révèle que les auto-anticorps de type anti-LKM2 sont apparus peu de temps après la commercialisation de l'acide tiénilique. Inversement, on retrouve systématiquement une prise d'acide tiénilique chez les patients où des anticorps anti-LKM2 avaient été détectés [6]. Les anti-LKM2 sont donc spécifiques de l'hépatite induite par la prise d'acide

tiénilique. Ils reconnaissent des autoantigènes qui ont été identifiés aux cytochromes P-450 de la famille IIC [3]. Ces P-450 sont responsables de la 5-hydroxylation de l'acide tiénilique chez l'homme et sont inhibés par les anti-LKM2. Sur des coupes de foie fœtaux humains où ces P-450 ne sont pas exprimés, les sérums contenant des anticorps anti-LKM2 ne reconnaissent aucune protéine.

1.8.2. L'hypothèse "d'activation-fixation-externalisation".

Ces résultats ont permis d'émettre une hypothèse sur les mécanismes intracellulaires qui conduisent à l'apparition de nouveaux antigènes présents à la surface de la cellule, c'est l'hypothèse "d'activation-fixation-externalisation" [3] (figure 8). Dans ce modèle, le P-450 réalise une activation métabolique de l'acide tiénilique qui va en retour se fixer sur ce même P-450. Cette protéine modifiée est ensuite externalisée sur la face externe de la membrane plasmique et devient un nouvel antigène exposé à la réaction du système immunitaire.

Actuellement nous savons que ce sont un ou plusieurs P-450 de la sous-famille IIC qui métabolisent l'acide tiénilique chez l'homme. Cette métabolisation s'accompagne d'une activation métabolique visible *in vitro* sous la forme d'une fixation covalente aux protéines microsomales. Par autoradiographie, Michèle Sonnier a pu montrer que cette fixation covalente était située au niveau des P-450. Catherine Pons a également développé un modèle d'étude chez le rat non-induit dans lequel le P-450 de rat IIC11 joue le rôle de cible reconnue par les anti-LKM2. De même que chez l'homme, ce P-450 métabolise l'acide tiénilique et est inhibé par les anti-LKM2 [15]. Par immunofluorescence indirecte sur hépatocytes de rat en survie, elle a montré qu'un traitement des rats par du clofibrate puis par de l'acide

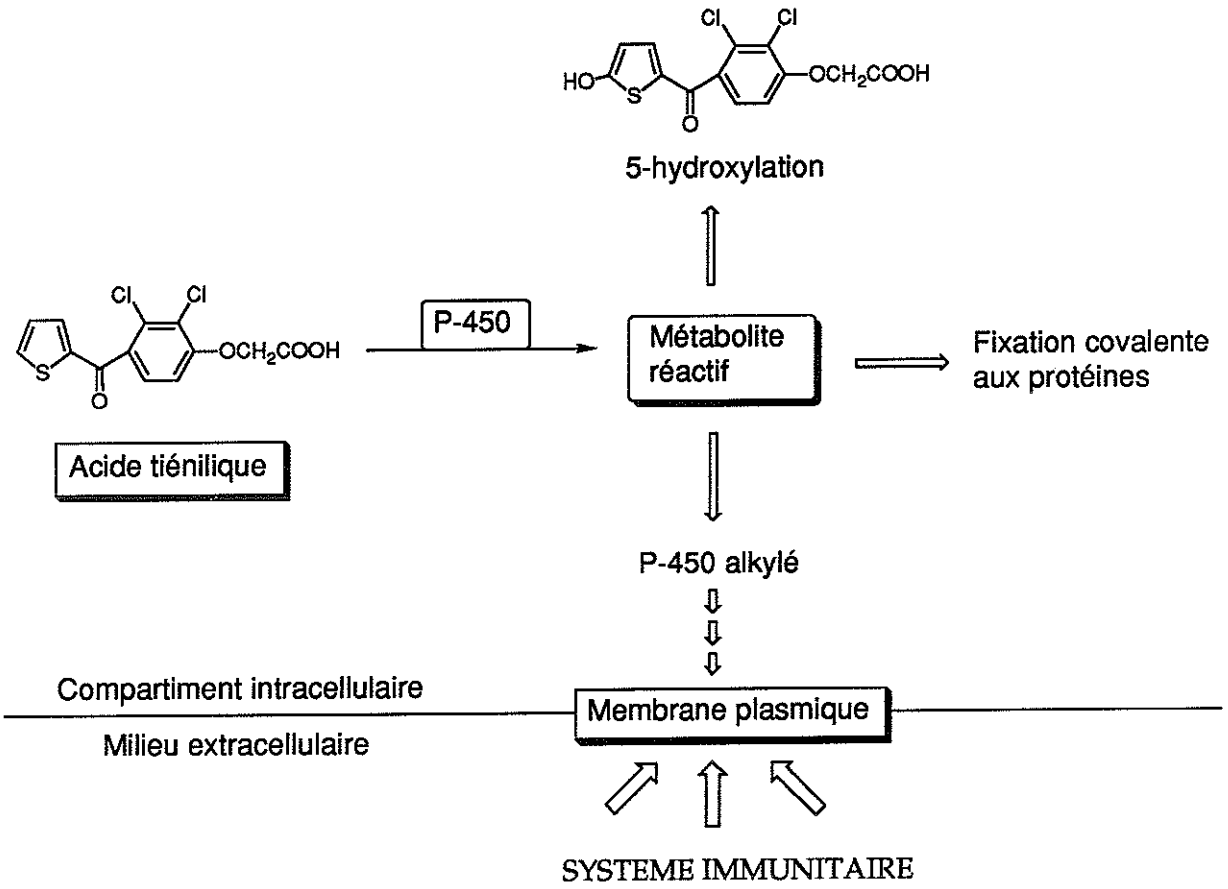


Figure 8 Hypothèse proposée pour expliquer l'apparition de néo-antigènes à la surface de la cellule hépatique dans le cas de l'AT [3].

tiénilique faisait apparaître un néoantigène reconnu par les anti-LKM2 à la surface de leur membrane plasmique ainsi que le P-450 IIC11 [46].

1.8.3. Rôle des néoantigènes.

Un nombre de plus en plus important d'autoanticorps anti-P-450 ont été découverts dans diverses pathologies hépatiques depuis leur première mise en évidence dans le cas de l'hépatite induite par l'acide tiénilique en 1987 [3]. En particulier, l'HCA autoimmune de type II est une hépatite spontanée de l'enfant dans laquelle aucun facteur environnemental précis n'a pu être mis en cause bien que suggéré [26]. L'HCA autoimmune apparaît comme une maladie d'étiologie plurifactorielle, génétique, virale et environementale. L'intérêt de l'étude de l'hépatite induite par l'AT est qu'elle constitue un modèle parfait d'une hépatite autoimmune à autoanticorps anti-P-450 dans laquelle le facteur exogène est identifié.

C'est au cours de sa métabolisation que l'AT acquiert sa toxicité. La formation d'une entité réactive, probablement un sulfoxyde de thiophène, s'accompagne d'une alkylation des protéines environantes, en particulier du P-450 lui-même. Ces protéines alkylées que nous appelerons <u>néoantigènes</u>, jouent un rôle central puisque leur disparition, par arrêt de l'exposition au médicament, s'accompagne d'une décrudescence du tableau clinique. Les questions posées par le rôle de ces néoantigènes peuvent se scinder en trois problèmes indépendants :

1- Formation et nature des néoantigènes : protéines impliquées (P-450), séquences protéiques et acides aminés impliqués, structure de ces métabolites fixés de façon covalente ?

2 - Comment et sous quelle forme ces néoantigènes apparaissent-ils à la surface de la membrane plasmique ?

3- Degré de reconnaissance des néoantigènes : reconnaissance d'un ou de plusieurs épitopes des P-450 (anticorps anti-LKM2) ? , reconnaissance des métabolites fixés (anticorps anti-médicament) ? , reconnaissance mixte par les anticorps anti-LKM2 d'une séquence des P-450 sur laquelle est fixée le médicament ?

La réponse à ces trois questions devrait nous renseigner sur les liens entre l'événement toxicologique, formation d'une entité réactive dans le P-450, et l'événement immunologique, apparition de la maladie autoimmune.

1.9. Projet de recherche.

L'existence d'anticorps anti-médicament n'a jamais été rapportée pour l'AT mais est une conséquence fréquente de l'activation métabolique des substances exogènes [47]. Cette réponse n'est pas dirigée contre le médicament lui-même mais contre le motif chimique constitué par un métabolite fixé de façon covalente, ce qui fait toute la difficulté de sa mise en évidence. Si l'on obtient une protéine modifiée par un haptène qui ressemble à ces métabolites fixés, elle pourra servir d'outil pour détecter et étudier la présence d'anticorps anti-médicament dans le sérum des patients. Par symétrie (figure 9), cette protéine modifiée pourra être également utilisée pour produire chez l'animal des anticorps capables de reconnaître les protéines hapténisées par les métabolites de l'AT. Ces anticorps seront un outil puissant pour l'étude des néoantigènes.

Dans le chapitre II nous présenterons les résultats concernant la préparation d'une protéine (sérumalbumine de bœuf, BSA) modifiée par un haptène dont on peut penser que la structure est analogue à celle des métabolites de l'AT fixés aux protéines microsomales après activation métabolique.

Dans le chapitre III nous présenterons les résultats concernant l'immunisation de lapins au moyen de cette protéine modifiée (BSA-AT) et la caractérisation des anticorps (Ac) obtenus (que nous nommerons par convention Ac anti-AT).

Dans le chapitre IV nous exposerons les résultats préliminaires sur la recherche d'Ac anti-médicament dans le sérum de patients atteints d'hépatite autoimmune induite par l'acide tiénilique.

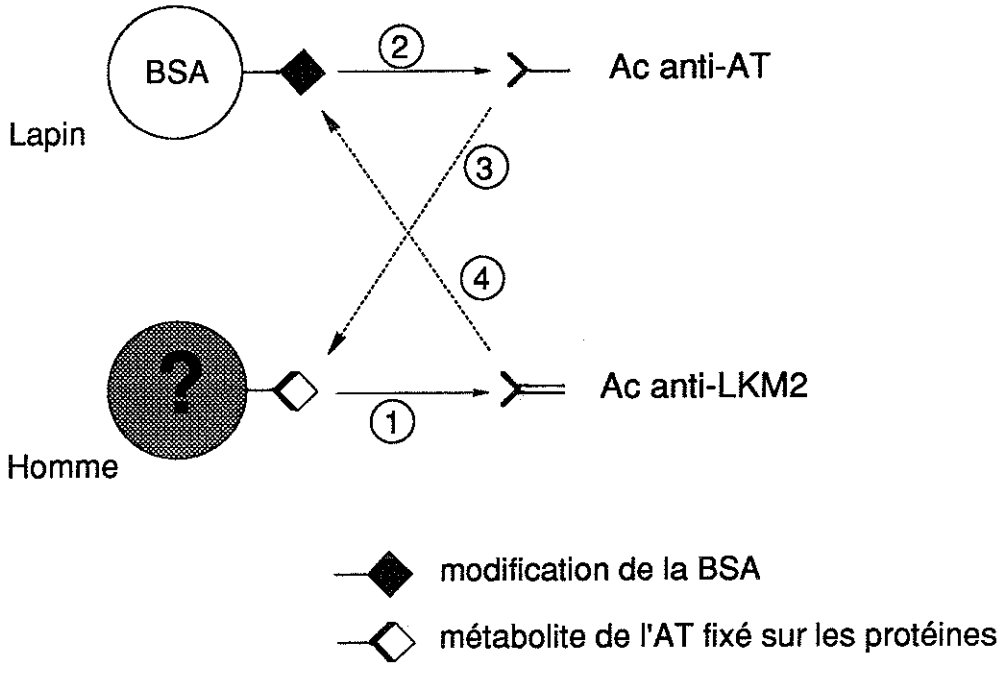


Figure 9 Hypothèse de reconnaissance croisée entre les anticorps anti-médicament humains et les anticorps anti-AT de lapin.

1 - les métabolites fixés de l'AT entraînent peut-être l'apparition d'Ac anti-médicament présents dans les Ac anti-LKM2,
2 - l'immunisation par la BSA modifiée entraîne l'apparition d'Ac anti-AT chez le lapin,
3 - si les Ac anti-AT reconnaissent le motif chimique constitué par un métabolite fixé sur une protéine,
4 - alors il est possible que les Ac anti-médicament reconnaissent la BSA modifiée.

CHAPITRE II

COUPLAGE DE L'ACIDE TIENILIQUE A LA SERUMALBUMINE DE BOEUF

2.1. Stratégie de couplage.

Catherine Pons avait tenté d'obtenir des Ac anti-AT chez le lapin [15]. L'échec de ces premiers anticorps s'explique par le mode de couplage retenu à l'époque, un couplage entre les fonctions amines des lysines de l'albumine et la fonction carboxyle de l'AT (figure 10).

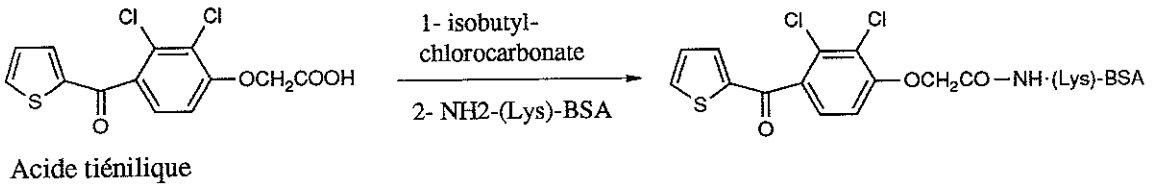
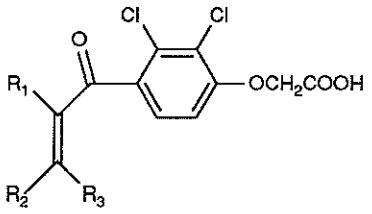
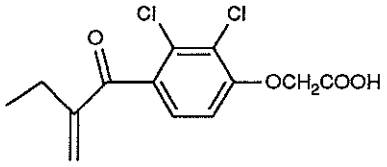


Figure 10 Principe du couplage de l'AT à la BSA par sa fonction carboxyle.

Que ce soient pour l'AT ou son isomère, l'activation métabolique de ces composés réalisée par les cytochromes P-450 a lieu au niveau du noyau thiophène, probablement par oxydation du soufre en sulfoxyde de thiophène. Il nous faut donc coupler l'AT à une protéine porteuse au niveau de ce noyau si l'on veut que l'haptène résultant ressemble aux métabolites de l'AT fixés aux protéines microsomales.



Motif commun aux métabolites du TAI



Acide éthacrynique **11**

Figure 11 Motif chimique commun à l'ensemble des métabolites du TAI et analogie avec la structure de l'acide éthacrynique 11.

L'ensemble des métabolites du TAI (figure 7, p. 20) a une structure commune qui comprend une double liaison conjuguée avec la cétone et la partie 2,3-cétodichlorophénoxyacétique. Ce motif est présent dans la structure d'un diurétique de la même famille, l'acide éthacrynique **11** (figure 11). Il est aussi probablement présent dans la structure des métabolites de l'AT.

Le seul métabolite connu de l'AT est le dérivé 5-hydroxylé **3** qui pourrait provenir de l'attaque nucléophile d'un ion hydroxyde en position 5 sur le cycle d'un éventuel sulfoxyde de l'AT. La cystéine est l'acide aminé majoritairement impliqué dans la réaction de fixation covalente du sulfoxyde du TAI aux protéines microsomales [44]. Il pourrait en être de même pour l'AT.

Compte tenu de ces remarques, nous avons choisi comme haptène l'AT substitué en 5 par un thioéther, lui-même relié à la protéine porteuse par sa chaîne latérale (figure 12).

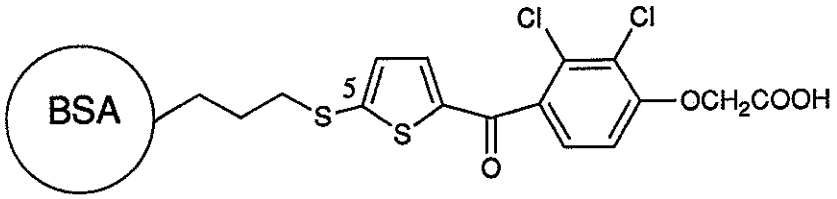


Figure 12 Couplage de l'AT à la BSA au niveau de la position 5 du noyau thiophène.

2.2. Réalisation.

Patrick Dansette avait montré au laboratoire que le chlore du dérivé 5-chloro-AT **12** peut être substitué par un thiol en milieu aqueux vers pH 10. Pour réaliser un couplage entre ce dérivé et la BSA, nous avons choisi de fixer en préalable des thiols sur l'albumine par la méthode au N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) [48] puis de les faire réagir avec **12** dans un deuxième temps. Le SPDP est un réactif bifonctionnel avec un acide 3-mercaptopropionique à la fonction acide activée par un groupe N-succinimide ester et un thiol bloqué dans une liaison dithioéther facilement réductible. La première étape est la formation à pH neutre d'une liaison amide entre le carboxyle activé et les amines libres des lysines de la BSA suivie immédiatement d'une libération des thiols par addition de dithiotréitol (DTT) (figure 13). Après purification, la BSA thiolée est mise à réagir avec le 5-chloro-AT **12** en anaérobiose à pH 10,3 et en fin de réaction, les éventuels thiols libres sont bloqués par l'iodoacétamide. Cette méthode fournit théoriquement une BSA substituée au niveau des lysines par de l'AT en position 5 via une chaîne intermédiaire de 4 atomes (BSA-AT) qui répond aux contraintes fixées par la stratégie de couplage.

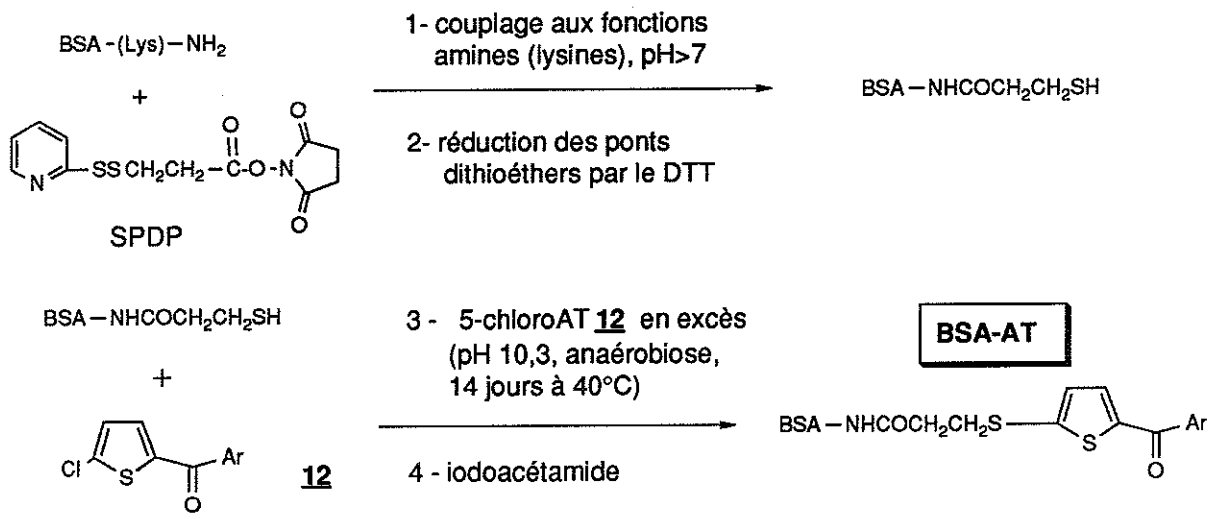


Figure 13 Principe de la méthode de couplage de l'AT à la BSA au niveau de la position 5 du noyau thiophène.

Nous avons également synthétisé le dérivé 5-S-mercaptoéthanol-AT **13** par addition nucléophile du mercaptoéthanol sur le composé **12** dans l'eau à pH 9.5 (bicarbonate) afin de comparer son spectre d'absorption U.V. avec celui de la BSA-AT.

2.3. Résultats.

Les conditions expérimentales sont décrites dans la partie expérimentale (paragraphe 6.2.1, p. 64). Au cours de la première étape, 30 équivalents de SPDP ont été mis à réagir et sont retrouvés fixés quantitativement à la BSA (après action du DDT, dosage des thiols libres par le réatif d'Ellman [49]). L'utilisation du dérivé **12** radioactif a permis la quantification de la deuxième étape, soit 14,6 molécules d'AT fixées par molécule de BSA-AT.

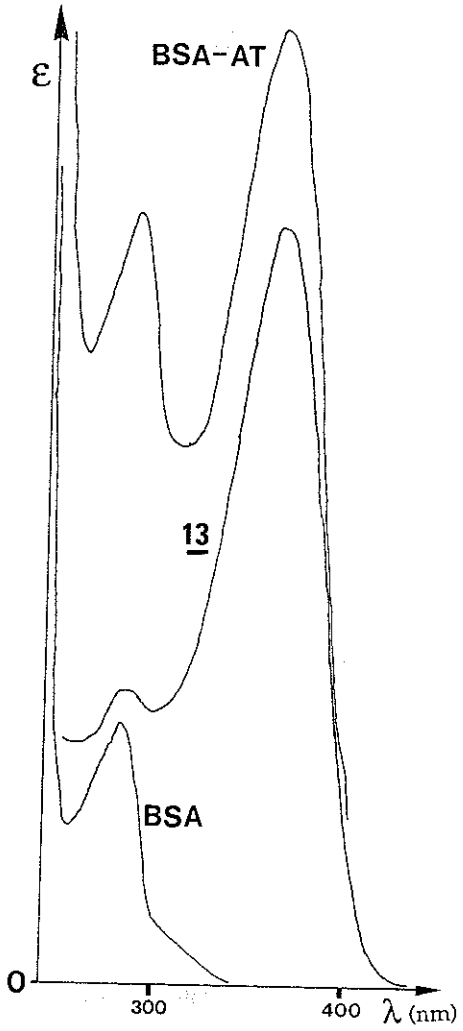


Figure 14 Comparaison des spectres d'absorption U.V. de la BSA-AT, de la BSA et du dérivé 5-S-mercaptoéthanol-AT 13 (seuls les spectres de la BSA et de la BSA-AT sont à la même échelle).

La comparaison du spectre d'absorption U.V. de la BSA-AT à celui de la BSA montre, à coté de la bande d'absorption à 280 nm des acides aminés aromatiques, un nouveau pic d'absorption intense à 364 nm (coefficient d'absorption molaire par AT de 15300 $M^{-1}.cm^{-1}$). Le dérivé 5-S-mercaptoéthanol-AT **13** possède une bande d'absorption U.V. similaire à 362 nm (coefficient d'absorption molaire de 15700 $M^{-1}.cm^{-1}$) (figure 14).

Une deuxième synthèse a été réalisée par Bernard Defosses au laboratoire. En fin de première étape, une fraction de la BSA thiolée a été traitée par l'iodoacétamide directement. La protéine obtenue (BSA-$[SCH_2CONH_2]_{30}$) présente un spectre d'absorption similaire à celui de la BSA. De meilleures conditions d'anaérobiose ont pu être obtenues au cours de la deuxième étape qui ont permis la fixation de 22 molécules d'AT par molécule de BSA après seulement 5 jours de réaction à 40°C. Le spectre U.V. de cette protéine est similaire à celui de la BSA-AT obtenue au cours de la première synthèse avec une bande intense d'absorption à 356 nm.

2.4. Discussion.

La BSA possède 59 résidus lysines et 1 cystéine libre. Le dosage par le réactif d'Ellman des thiols libérés par le DTT en fin de la première étape de synthèse met en évidence une fixation quantitative des 30 équivalents de SPDP mis à réagir. Le rendement de la deuxième étape dépend de la qualité de l'anaérobiose nécessaire au maintien des thiols sous forme réduite. En effet, au cours de la première synthèse de la BSA-AT, la mauvaise qualité de l'anaérobiose a eu pour conséquence une précipitation de la BSA thiolée, probablement par formation de ponts disulfures. L'addition de DTT a permis de maintenir les thiols sous forme réduite, mais la réaction a été plus longue (14 jours) et seulement 14,6 molécules d'AT ont pu être fixées. La bande intense d'absorption U.V. à 362 nm du dérivé 5-S-mercaptoéthanol-AT **13** est spécifique de la substitution du noyau thiophène en position 5 par un thioéther (le TAI ne présente dans cette région qu'une bande d'absorption à 261 nm). La BSA-AT possède une bande de mêmes caractéristiques. L'AT est donc bien fixé à la BSA par l'intermédiaire d'une chaîne comportant un soufre qui substitue le noyau thiophène en position 5.

CHAPITRE III

IMMUNISATION DE LAPINS PAR LA BSA-AT ET PREPARATION D'ANTICORPS ANTI-AT.

Dans le but de produire des anticorps capables de reconnaître les métabolites de l'AT fixés de manière covalente aux protéines microsomales après activation métabolique (Ac anti-AT), des lapins ont été immnunisés contre la BSA-AT. Dans un premier temps un test Elisa (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) de détection des Ac anti-AT a été développé. Des protéines microsomales, au préalable incubées avec de l'AT ou du TAI et un système générateur de NADPH, ont servi à sensibiliser les puits Elisa. Au moyen de ce test, nous avons sélectionné le lapin qui présentait le meileur titre en Ac anti-AT.

Pour identifier la nature des déterminants chimiques reconnus par les Ac anti-AT, nous avons testé la capacité de différents analogues de structure de l'AT à inhiber par compétition, dans le test Elisa mis au point précédemment, la reconnaissance de métabolites du TAI ou de l'AT fixés sur les protéines microsomales.

3.1. Protocole d'immunisation.

Cinq lapines New Zealand âgées de 3 mois, numérotées de 1 à 5, ont été immunisées avec une émulsion d'une solution dans du sérum physiologique de BSA-AT avec de l'adjuvant de Freund (partie expérimentale 6.3, p.67). Le sang a été prélevé 10 à 15 jours suivant chaque

rappel et les sérums ont été préparés. Cinq prélèvements ont été ainsi collectés : prélèvements 0 (sérum préimmun, avant toute immunisation) puis I à IV.

3.2. Etude de la réponse anti-BSA-AT par double diffusion en gel d'agarose.

Nous avons utilisé la méthode de double diffusion en gel d'agarose (technique d'Ouchterlony) pour étudier la réponse anti-BSA-AT sur les différents prélèvements. Des gels d'agar tamponnés à pH 7,4 ont été coulés sur une plaque de Gel-bond avec une épaisseur de 1,5 mm. A l'aide d'une empreinte, les puits destinés aux sérums à tester ont été creusés selon un maillage hexagonal centré par un puits où a été déposé soit une solution de BSA-AT, soit une solution de BSA à différentes concentrations (1 mg/ml à 31,5 µg/ml dilué de 2 en 2). Nous avons également étudié l'influence, sur l'apparition des arcs de précipitation du prélèvement IV, de l'AT (1 mM) ou du 5-S-mercaptoéthanol-AT **13** (1 mM) préincubé 60 min. avec les sérums à tester et incorporé au sein du gel d'agar. Après un jour à 4°C, les arcs de précipitation sont révélés au bleu de Coomassie (partie expérimentale 6.4, p. 68).

Les résultats sont présentés dans le tableau 4. Tous les sérums issus du prélèvement IV donnent, en présence de BSA-AT, un arc de précipitation intense et confluent, maximum pour les lapins 2 et 4 (arcs fins pour 1 mg BSA-AT/ml) (figure 15). En présence d'AT ou de **13**, ces arcs n'apparaissent pas. Il existe un deuxième arc, moyennement intense, présent chez les lapins 2 et 5. Une réponse anti-BSA, peu intense, est détectée chez les lapins 1, 2, 4 et 5 (arcs fins pour BSA 62 µg/ml). Les sérums préimmuns (prélèvement 0) ne donne aucun arc de précipitation avec la BSA-AT. Les

arcs donnés par le prélèvement I se différencient de ceux donnés par les autres prélèvements par un dédoublement des réponses anti-BSA-AT et anti-BSA (tableau 4).

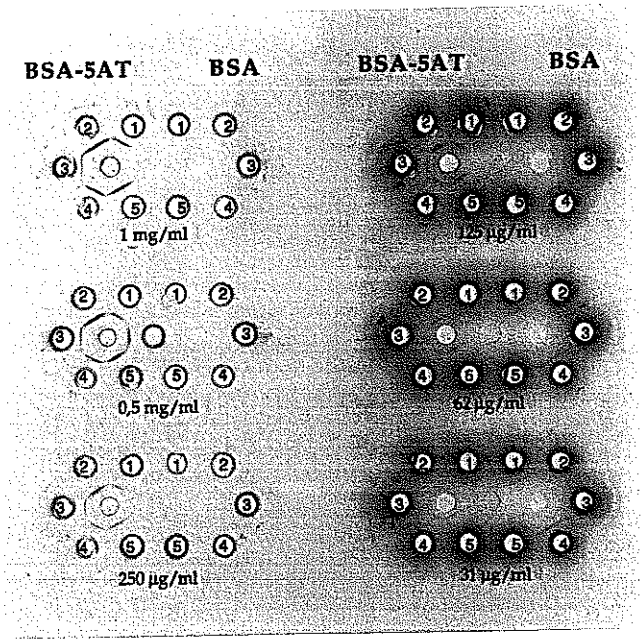


Figure 15 Arcs de précipitation (technique d'Ouchterlony) entre la BSA-AT ou la BSA et les sérums du prélèvement IV.

Tableau 4 Analyse semi-quantitative des arcs de précipitation mis en évidence par la technique d'Ouchterlony entre les différents sérums et la BSA-AT ou la BSA.

Lapin	1	2	3	4	5
Prélèvement O					
BSA-AT	o	o	o	o	o
Prélèvement IV					
BSA-AT	+++ (1000)[1]	++++ (1000) + (250)	+ (500)	++ (500)	+++ (1000) +/- (125)
+ AT ou 13 1 mM	o	o	o	o	o
BSA	+/- (31)	+/-- (31)	o	+/- (31)	+/- (31)
Prélèvement I					
BSA-AT	+++ (1000) +/- (62)	++++ (1000) +/- (250) + (62)	++ (500) +/- (62)	++ (500)	+++ (1000) +/- (250)
BSA	o	o	o	+ (62) + (62)	+ (62) + (62)

[1] l'intensité des arcs de précipitation est appréciée à l'œil nu selon une échelle de 7 valeurs (0, +/--, +/-, +, ++, +++, ++++), entre parenthèses est donnée la concentration de BSA-AT ou de BSA qui donne l'arc le plus fin et le plus médian, en µg/ml)

3.3. Mise en évidence par test Elisa d'une réponse dirigée contre les métabolites du TAI fixés de façon covalente aux protéines microsomales.

Nous avons d'abord travaillé avec le TAI à cause des quantités importantes de métabolites fixés sur les protéines microsomales que l'on peut obtenir avec ce substrat. Dans un premier temps, nous avons préparé des protéines microsomales avant de les fixer sur les plaques Elisa.

Les métabolites du TAI fixés sur les protéines de manière covalente sont encore réactif en fin d'incubation et un traitement par HCl entraîne leur stabilisation [44]. Une incubation (20 min. à 37°C) de TAI (100 µM) en présence de microsomes de rat induit par le clofibrate (P-450 1 µM) avec ou sans système générateur de NADPH a été traitée par de l'HCl (2N) pendant une heure à 37°C. Après plusieurs lavages au méthanol, les protéines microsomales ont été remises en solution dans de la soude 0,1N avant dilution choisie dans le tampon de sensibilisation de l'Elisa (partie expérimentale 6.6, p. 70). L'utilisation de TAI radioactif ne met pas en évidence une perte des métabolites au cours de ces différents lavages. Le lavage au méthanol s'est par ailleurs révélé efficace puisque la quantité de radioactivité présente dans les protéines issues de l'incubation en l'absence de système générateur de NADPH est négligeable. Toutefois nous n'avons pas réussi à doser correctement les protéines ayant subi le traitement par HCl.

Le protocole des tests Elisa est détaillé dans la partie expérimentale 6.7 (p. 74). Les puits ont été activés par 75 pmol de métabolites de TAI fixés de manière covalente aux protéines microsomales traitées selon le protocole précédent. Les puits témoins contiennent une quantité équivalente de protéines microsomales issues des incubations sans système générateur. La

fixation non-spécifique des anticorps anti-AT a été bloquée par de la gélatine. Les complexes antigène-anticorps ont été révélés par des anticorps anti-Ig de lapin marqués à la peroxydase avec l'ABTS comme substrat (20 min. à 37°C). Tous les prélèvements ont été testés avec des dilutions de 4 en 4, du 1/200ième au 1/204800ième. Chaque mesure a été réalisée en duplicat.

Tous les sérums immuns donnent un signal intense (en moyenne 1 unité de D.O. avec les sérums dilués au 1/200ième) dans les puits sensibilisés par des protéines microsomales issues d'incubation de TAI en présence de système générateur en NADPH, au contraire des puits témoins où la coloration est au moins 10 fois plus faible et disparaît plus rapidement au fur et à mesure des dilutions. L'ensemble des titres (définis par la dilution du sérum qui donne une coloration d'intensité moitié de l'intensité maximale) est résumé dans le tableau 5. Ces titres sont compris entre 1/5000ième et 1/50000ième (prélèvement IV, lapin 2). Les lapins 1 et 2 donnent les titres les plus forts, le sérum préimmun du lapin 2 ne donne aucun signal (figure 16).

Tableau 5 Titres Elisa observés sur l'ensemble des prélèvements.

Lapin	1	2	3	4	5
Prélèvement O		pas de titre			
Prélèvement I	1/8000	1/20000	1/5000	1/4000	1/5000
Prélèvement II	1/13000	1/25000	1/12000	1/13000	1/10000
Prélèvement III	1/8000	1/15000	1/5000	1/6000	1/5000
Prélèvement IV	1/14000	1/50000	1/6000	1/8000	1/5000
Titre moyen	1/10000	1/27000	1/7000	1/8000	1/6000

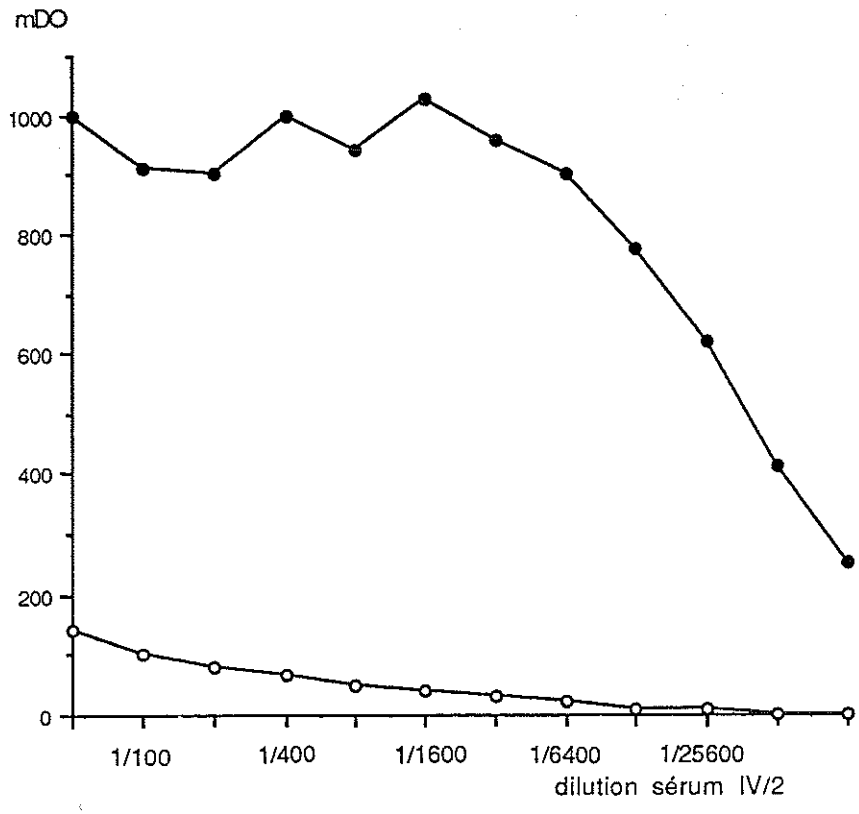


Figure 16 Courbes Elisa obtenues avec le prélèvement IV du lapin 2. les puits sont activés avec des protéines issues d'incubations de TAI avec des microsomes CLO en présence (•) ou en absence (○) de système générateur de NADPH (75 pmol de métabolites du TAI fixés aux protéines par puits) ; voir également les courbes de calibration du test Elisa sur la figure 26, p. 76.

3.4. Estimation de l'affinité des anticorps anti-AT pour le TAI.

3.4.1 Principe.

La mesure de l'affinité d'un anticorps par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium [50] est de réalisation simple pour peu que l'on dispose d'un antigène radioactif. Nous avons appliqué cette méthode aux différents sérums du prélèvement IV et estimé l'affinité des anticorps anti-

AT pour le TAI, dans le but de compléter les éléments du choix du lapin meilleur répondeur (partie expérimentale 6.5, p. 69).

3.4.2. Résultats.

Le comptage fournit la fraction liée (concentration de TAI lié aux Ig mesurée par différence avec la valeur obtenue avec le sérum préimmun) ; la fraction libre est calculée par soustraction de la fraction liée à l'ensemble du TAI présent.

Le signal non-spécifique obtenu avec les sérums préimmuns est entre 30 et 40 fois inférieur au signal obtenu avec les sérums immuns. La représentation de l'inverse de la fraction liée en fonction de l'inverse de la fraction libre met en évidence, pour chacun des sérums, une linéarité qui reflète l'équilibre antigène-anticorps (figure 17). La capacité de fixation maximale du sérum pour le TAI correspond à la fraction liée extrapolée pour une concentration de TAI infinie (lorsque la droite de régression coupe l'axe des ordonnées, c'est à dire pour une valeur de l'inverse de la fraction libre égale à 0) et la constante d'affinité à l'inverse de la concentration qui donne la moitié de cette fixation maximale (tableau 6). En supposant 2 sites de fixation par Ig, on peut calculer la concentration en Ig G spécifiques du TAI présente dans chaque sérum (avec un poids moléculaire de 150000 Daltons par Ig G, les autres Ig ont été négligées).

Les sérums des lapins immunisés par la BSA-AT ont une affinité spécifique pour le TAI avec une capacité maximale de fixation importante surtout pour le lapin 2. Les Ka obsvervés sont faibles, de l'ordre de 10^6 mais ne préjugent pas de la présence de sous-populations d'Ig G d'affinité beaucoup plus importante (la méthode utilisée considère essentiellement les anticorps de faible affinité).

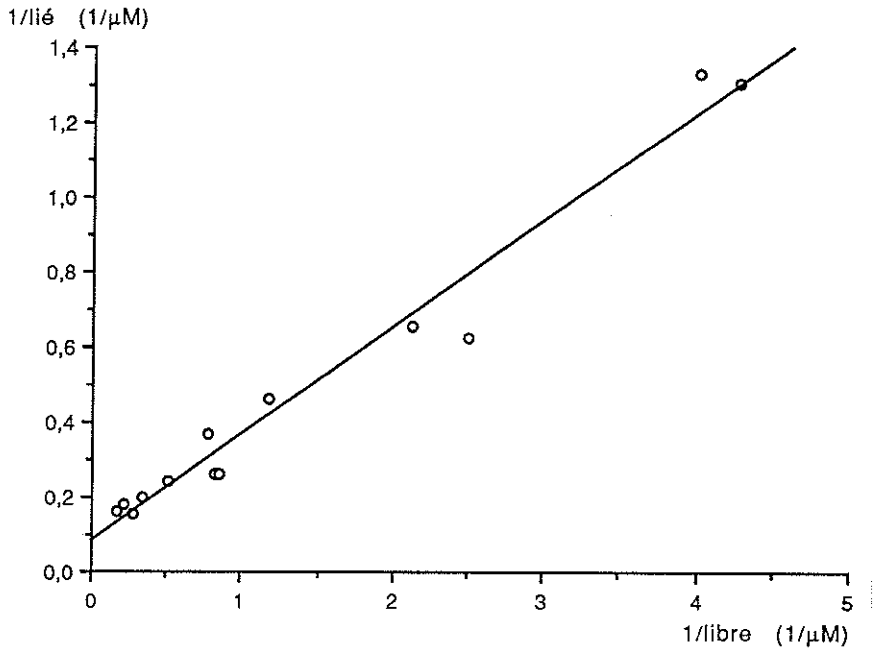


Figure 17 Estimation de l'affinité des Ac anti-AT pour le TAI par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium (sérum IV du lapin 2, échelle des ordonnées en rapport avec une dilution au 1/5ième du sérum).

Tableau 6 Fixations maximales des sérums et constantes d'affinité Kaobs. des Ac anti-AT pour le TAI mesurées sur les sérums du prélèvement IV par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium.

Lapin	fixation maximale	Ig G	Ka obs.
1	15 µM	2,25 mg/ml	$1,4.10^6$ M^{-1}
2	45	6,75	5.10^5
4	10	1,5	$1,5.10^6$
5	25	3,75	$1,4.10^6$

3.5. Préparation de la fraction des immunoglobulines des sérums du lapin meilleur répondeur et mise en évidence d'une réponse anti-AT.

L'immunisation chez le lapin contre la BSA-AT conduit à l'apparition d'anticorps spécifiquement dirigés contre l'haptène fixé sur la BSA-AT puisque la reconnaissance est inhibée par l'AT et le dérivé **13**. Ces anticorps n'existaient pas avant l'immunisation. Il existe une réponse faible dirigée contre la protéine porteuse. La présence d'un deuxième arc, moins intense, chez les lapins 2 et 5 dans les derniers prélèvements, inhibée par l'AT, peut s'interpréter en terme de reconnaissance de l'haptène et de la séquence protéique sous-jacente au niveau d'un épitope différent de celui reconnu dans l'arc principal. Le dédoublement des arcs obtenus avec les sérums du prélèvement I est probablement dû à des immunoglobulines M de la réponse immunitaire primaire.

Par la technique de l'Elisa, les sérums immuns reconnaissent très spécifiquement les protéines microsomales hépatiques de rat sur lesquelles le TAI s'est fixé de manière covalente après activation métabolique en présence des P-450 et d'un système générateur en NADPH. Les sérums prélevés sur le lapin 2 donnent les arcs de précipitation les plus intenses en Ouchterlony ; ces sérums sont très riches en Ac capables de fixer le TAI et donnent le meilleur titre en Elisa. Nous avons regroupé l'ensemble des prélèvements de ce lapin meilleur répondeur (à l'exception des prélèvements 0 et I) et préparé la fraction des immunoglobulines par précipitation au sulfate d'ammonium (partie expérimentale 6.3.4, p. 68). Les résultats exposés dans la suite de ce travail ont été obtenus au moyen de cette fraction.

Des protéines ayant fixé les métabolites de l'AT ont été préparées selon le protocole utilisé pour le TAI (partie expérimentale 6.6, p. 70). Nous

avons également calibré les tests Elisa pour déterminer la quantité optimale de protéines servant à activer les puits (partie expérimentale 6.1.2, p. 74). Ainsi les Ig du lapin 2 donnent, avec 10 pmol d'AT fixé aux protéines/puits, un titre au 1/9000ième et, avec 20 pmol/puits de TAI fixé aux protéines/puits, un titre au 1/16000ième.

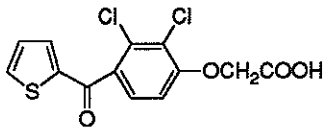
3.6. Caractérisation de l'épitope de l'acide tiénilique reconnu par les anticorps anti-AT.

Le but est premièrement de déterminer la nature de l'épitope reconnu par les anticorps anti-AT et deuxièmement de déterminer les critères structuraux qui feront qu'un métabolite de l'AT ou du TAI sera ou non reconnu par ces anticorps. Ainsi, nous avons testé la capacité de différents analogues de structure de l'AT à inhiber par compétition, dans le test Elisa mis au point précédemment, la reconnaissance de métabolites du TAI ou de l'AT fixés sur les protéines microsomales.

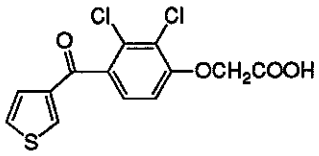
3.6.1. Méthodes.

Les Ig du lapin 2 sont préincubées une nuit à 4°C en présence de l'inhibiteur à différentes concentrations (entre 1 nM et 1 mM selon les inhibiteurs), de tween et de gélatine (mêmes concentrations que dans l'Elisa). Dans un deuxième temps, un test Elisa est réalisé et la concentration pour laquelle l'inhibiteur diminue de 50% le signal obtenu en l'absence de tout inhibiteur est déterminée.

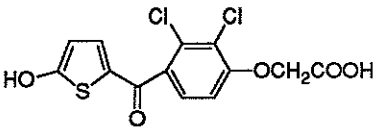
Les plaques ont été sensibilisées par des protéines microsomales ayant fixé des métabolites soit du TAI (20 pmol de métabolites/puits) soit de l'AT (10 pmol/puits) et traitées par HCl. Les blancs ont été réalisés par sensibilisation des puits au moyen de protéines microsomales issues d'incu-



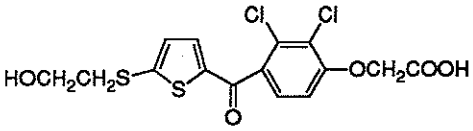
AT 1



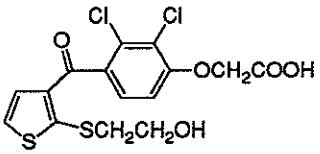
TAI 2



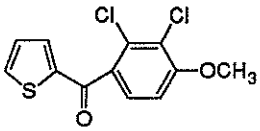
5-hydroxy-AT 3



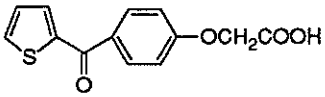
5-S-mercaptoéthanol-AT 13



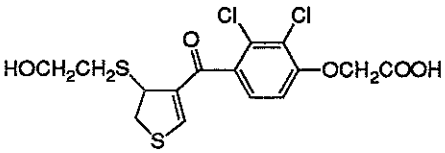
2-S-mercaptoéthanol-TAI 14



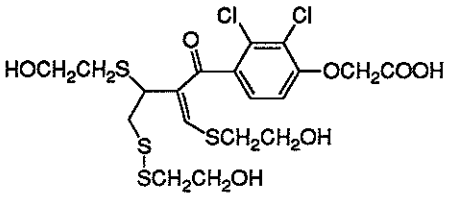
16



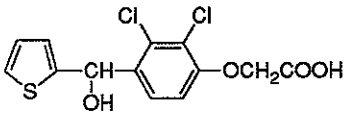
17



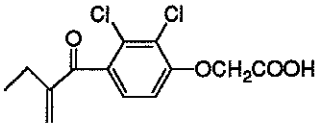
9



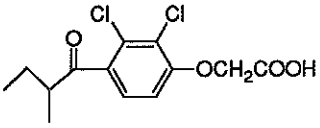
8



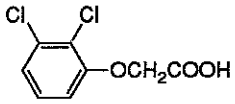
5



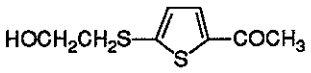
Ac. éthacrynique 11



Ac. dihydroéthacrynique 15



Ac. 2,3-dichlorophénoxyacétique 18



19

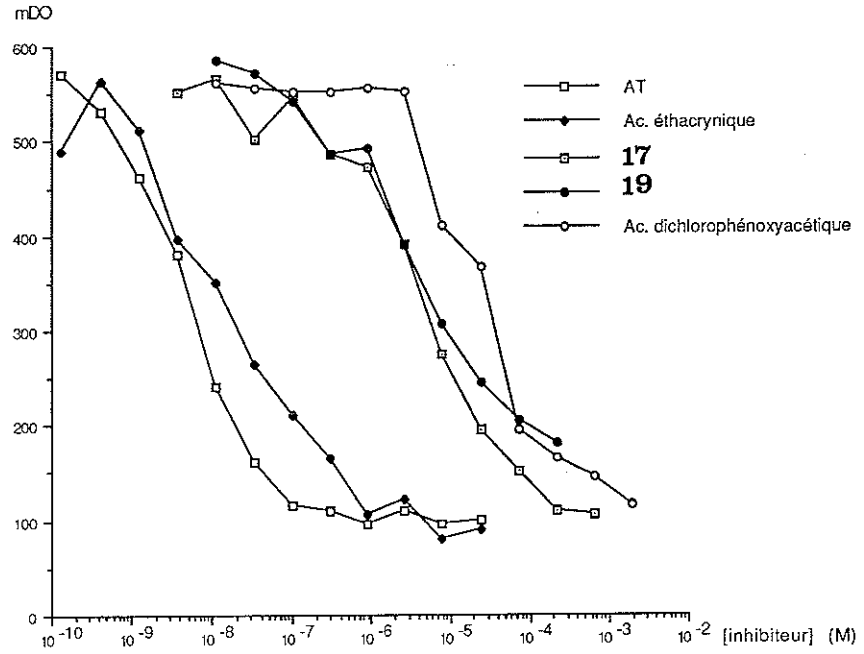
Figure 18 Structure des inhibiteurs testés.

bations sans système générateur en NADPH. Les tests Elisa ont été calibrés pour donner le meilleur signal. La nomenclature et les formules des inhibiteurs testés sont présentées dans la figure 18, l'origine et les différentes synthèses d'inhibiteurs sont décrites dans la partie expérimentale 6.9 (p.77). Pour les plaques sensibilisées par du TAI, chaque point est le résultat de 8 mesures (4 signaux, 4 blancs, en 2 expériences réalisées en duplicat sur des séries de plaques manipulées des jours différents) (4 mesures pour les plaques sensibilisées par l'AT).

3.6.2. Résultats.

Avec 20 pmol/puits de métabolites du TAI fixés de manière covalente aux protéines microsomales, les Ig du lapin 2 diluées au 1/20000ième et une révélation à l'ABTS de 20 min. à 37°C, le test Elisa donne une coloration reproductible de 500 mDO. En présence de concentrations croissantes des différents inhibiteurs, le signal décroît régulièrement jusqu'à abolition complète selon une courbe sigmoïde (figure 19) sauf pour le dérivé **19** dont le caractère peu soluble limite son utilisation au delà de 210 µM. Dans le tableau 7 est indiquée la concentration de chacun des inhibiteurs qui diminue le signal de 50% (point d'inflexion de la sigmoïde), cette valeur a été extrapolée pour le dérivé **19**.

Dans le cas de l'AT fixé de manière covalente aux protéines microsomales (10 pmol/puits, Ig du lapin 2 diluées au 1/5000ième), le signal est de 550 mDO en l'absence d'inhibiteur (révélation à l'ABTS 20 min. à 37°C) et décroît régulièrement aux concentrations croissantes de chacun des inhibiteurs testés jusqu'à un plateau de 100 mDO (figure 19). Les valeurs des concentrations qui inhibent 50% de l'amplitude du signal (amplitude de 325 mDO entre la valeur mesurée sans inhibiteur et le plateau de 100



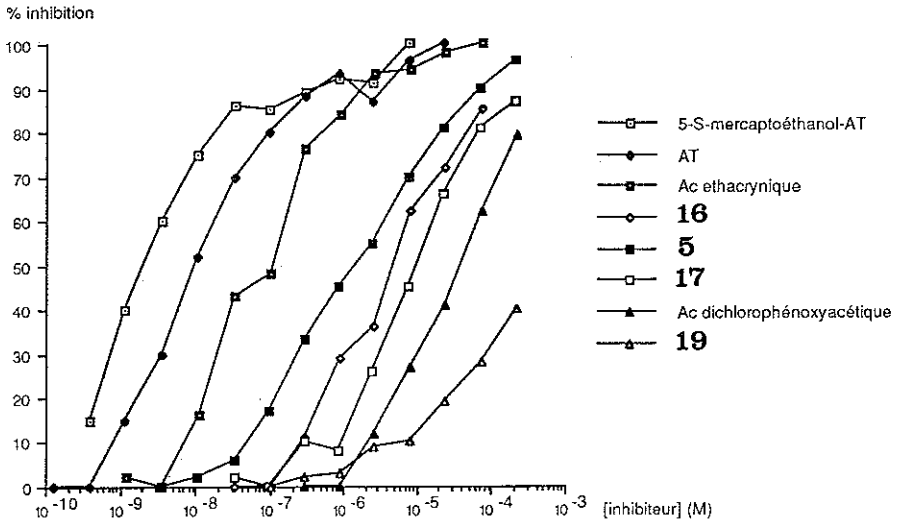


Figure 19 Courbes d'inhibition compétitive du test Elisa (en haut les puits sont activés par des métabolites de l'AT fixés aux protéines microsomales et en bas avec ceux du TAI).

mDO) sont du même ordre de grandeur que celles observées avec les métabolites du TAI fixés aux protéines microsomales sauf pour le dérivé **19** qui est un meilleur inhibiteur dans cette expérience (tableau 7).

Tableau 7 Inhibition compétitive par des analogues de l'AT de la reconnaissance par les Ac anti-AT. (concentration en nM pour laquelle chaque analogue diminue le signal de l'Elisa de 50% ; les plaques sont activées avec des protéines microsomales ayant fixé soit des métabolites du TAI, soit des métabolites de l'AT).

Inhibiteur		Plaques activées par des métabolites du TAI	de l'AT
		(nM)	(nM)
5-S-mercaptoéthanol-AT	13	2,3	
AT	1	7,5	4,5
TAI	2	17	4,5
2-S-mercaptoéthanol-TAI	14	31	
	9	39	
Ac. éthacrynique	11	50	13,5
5-hydroxy-AT	3	80	
Ac. dihydroéthacrynique	15	150	
	8	260	
	5	1400	
	16	8800	
	17	10600	4600
Ac. dichlorophénoxyacétique	18	32800	29700
	19	460000	4600

3.7. Discussion.

Nous nous sommes donnés pour but de produire des anticorps polyclonaux chez le lapin capables de reconnaître les métabolites de l'AT fixés de manière covalente aux protéines microsomales après activation métabolique réalisée par les cytochromes P-450. Pour cela, nous avons immunisé 5 lapins avec de la BSA-AT dont la structure doit ressembler à celle des métabolites de l'AT. Le nombre de molécules fixées par molécule de BSA, 14,6, est suffisant pour envisager une immunisation.

Pour étudier les sérums immuns, nous avons développé un test Elisa dans lequel les plaques ont été sensibilisées par des protéines microsomales ayant fixé ou non les métabolites réactifs du TAI (en présence ou en absence de système générateur de NADPH). Les sérums immuns reconnaissent très spécifiquement les protéines issues d'incubations conduites en présence de système générateur de NADPH. Nous pouvons conclure que l'ensemble des lapins a répondu en produisant des anticorps spécifiques des métabolites du TAI fixés de manière covalente aux protéines microsomales. Les sérums du lapin 2 donnent le meilleur titre dans ce test, par la suite nous avons uniquement travaillé avec la fraction des Ig des sérums immuns de ce lapin. Une reconnaissance des métabolites de l'AT fixés de manière covalente aux protéines microsomales est également observée avec ces Ig, il y a donc reconnaissance croisée entre les métabolites du TAI et ceux de l'AT.

Dans un deuxième temps nous avons étudié la nature des déterminants chimiques reconnus par ces anticorps par inhibition compétitive du test Elisa par des analogues de l'AT. Dans les expériences d'inhibitions où des métabolites du TAI sont fixés aux protéines microsomales, tous les inhibiteurs (à part le cas particulier du dérivé **19**) inhibent complètement, à fortes concentrations, la fixation des anticorps

anti-AT. L'épitope reconnu sur ces métabolites est donc unique (il n'y a qu'un seul site de reconnaissance de ces métabolites par les anticorps anti-AT). Le dérivé **13** qui présente le plus d'analogie avec l'haptène de la BSA-AT est le meilleur compétiteur. L'AT, le TAI et le dérivé **14** forment le groupe des inhibiteurs où la partie thiophénique est aromatique et le noyau phénoxyacétique présent. Ces composés inhibent à 50% la fixation des anticorps pour une concentration moyenne de 16 nM. La présence du résidu mercaptoéthanol est donc peu importante dans la reconnaissance des métabolites par les Ac anti-AT. Le rapport des concentrations qui inhibent le signal de 50% pour deux inhibiteurs est un moyen souvent utilisé pour estimer l'affinité relative des anticorps vis à vis de l'élément de structure qui les différencie [51]. La comparaison des inhibitions réalisées par le dérivé **13** et par l'AT montre une différence d'un facteur 3. On peut donc estimer à 3 la contribution du résidu mercaptoéthanol dans la reconnaissance du dérivé **13** par les anticorps anti-AT.

Un deuxième groupe est constitué par les dérivés qui comportent le motif acide éthacrynique, ce sont les dérivés **9**, **8** et l'acide éthacrynique **11**. Ces composés inhibent le test Elisa de 50% à la concentration moyenne de 116 nM, ce sont donc de bons inhibiteurs. Ce résultat montre que nous avons atteint l'objectif défini avec la stratégie de couplage, à savoir que nous voulions des anticorps capables de reconnaître le motif commun à l'ensemble des métabolites de piégeage du TAI (figure 11). Par comparaison avec les dérivés du premier groupe, la disparition du noyau thiophène diminue l'affinité des Ac anti-AT d'un facteur de l'ordre de 7 ($116/16 \neq 7$). Le dérivé **3**, malgré la présence d'une charge négative sur sa partie thiophénique, reste un bon inhibiteur (80 nM).

La double liaison de l'acide éthacrynique intervient pour un facteur 3 estimé par comparaison des inhibitions réalisées par l'acide éthacrynique et l'acide dihydroéthacrynique (**15**/**11** = 150/50 = 3). Le noyau thiophène contribue donc pour un facteur de l'ordre de 20 (≠3x7). La perte de la fonction cétone s'accompagne d'une diminution importante de l'affinité des anticorps d'un facteur d'environ 200 que l'on trouve soit en comparant l'AT réduit **5** avec l'AT (1400/7,5 ≠ 190), soit en comparant l'acide dichlorophénoxyacétique **18** avec l'acide dihydroéthacrynique **15** (32800/150 ≠ 220). Les deux chlores fournissent une contribution importante de l'ordre de 1400, soit environ 40 par atome de chlore. Mais le facteur le plus grand provient du groupe carboxylique qui est, en comparant le dérivé **16** avec l'AT, de l'ordre de 1200 (figure 20). En conclusion, les anticorps anti-AT que nous avons obtenu reconnaissent les métabolites du TAI par la partie non-thiophénique du TAI, c'est à dire par le motif 4-céto, 2,3-dichlorophénoxyacétique. Trois déterminants chimiques sont à l'origine de cette reconnaissance, ce sont la fonction cétone, les deux atomes de chlore et le groupe carboxyle ; le noyau benzénique intervient probablement en fixant une orientation spatiale précise à l'ensemble.

Dans le cas des expériences d'inhibition réalisées avec des plaques sensibilisées par des métabolites de l'AT fixés aux protéines microsomales, l'inhibition n'est jamais complète mais garde l'aspect d'une sigmoïde avec un plateau identique pour chacun des inhibiteurs. Il paraît plus vraisemblable que cette D.O. résiduelle soit un artefact, par exemple dû à la plus forte concentration en anticorps anti-AT utilisée dans cette expérience, plutôt que le reflet d'une fixation sur d'autres déterminants chimiques que l'AT ne pourrait pas inhiber.

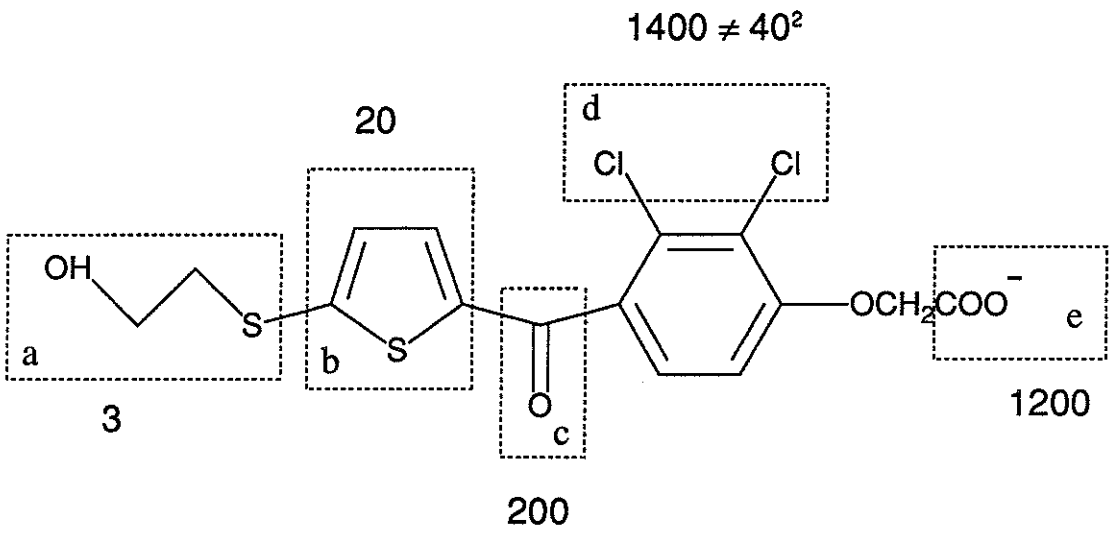


Figure 20 Effets des différents déterminants chimiques du dérivé 13 sur la reconnaissance par les Ac anti-AT estimés par les expériences d'inhibition du test Elisa. Les valeurs données sont calculées en comparant la capacité de divers analogues de structure à inhiber compétitivement la fixation des Ac anti-AT dans le test Elisa, soit a) AT comparé à 13, b) acide dihydroéthacrynique comparé à l'AT, c) 5 comparé à l'AT, d) 17 comparé à l'AT et e) 16 comparé à l'AT.

Le dérivé 19 est un bien meilleur inhibiteur dans ce test. Ce motif pourrait participer à la reconnaissance des métabolites de l'AT fixés aux protéines microsomales par les anticorps anti-AT. Autrement dit la structure 5-thioéther, 2-aroyl-thiophène pourrait faire partie de l'épitope reconnu dans les protéines incubées avec l'AT et être absent de celui présent dans les protéines incubées avec le TAI.

Les anticorps obtenus par immunisation chez le lapin par de la BSA-AT reconnaissent spécifiquement les métabolites de l'AT ou du TAI fixés de façon covalente aux protéines microsomales. Cette reconnaissance se fait

principalement par l'intermédiaire du motif 4-céto-2,3-dichloro-phénoxyacétique. Ce motif est probablement présent dans l'ensemble de ces métabolites qui sont donc à priori tous reconnus par les Ac anti-AT. Ces anticorps vont pouvoir servir d'outil pour étudier les protéines modifiées par ces molécules aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Des résultats préliminaires laissent penser qu'ils sont plus sensibles, par la technique d'immunotransfert, que l'autoradiographie au moyen d'AT radioactif.

CHAPITRE IV

RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI-MEDICAMENT DANS LES SERUMS DE PATIENTS ATTEINTS D'HEPATITE SECONDAIRE A LA PRISE D'AT

4.1. Méthodologie.

Notre but est d'étudier l'éventuelle reconnaissance de la BSA-AT par les sérums de patients atteints d'une hépatite autoimmune secondaire à la prise d'AT. Une telle reconnaissance pourrait être en rapport avec la présence d'anticorps anti-médicament dans ces sérums.

Plusieurs types de sérums ont été testés :

- le sérum d'un patient atteint d'hépatite et prélevé alors qu'il prenait encore de l'AT (KUT),
- un sérum d'un patient également malade mais prélevé 3 mois après l'arrêt de la prise d'acide tiénilique (JOR),
- 2 sérums de patients non-atteints d'hépatite mais ayant pris de l'AT depuis au moins 1 an (DEL et BEN),
- 7 sérums de personnes témoins ne recevant pas de traitement à base d'AT (TIA, REN, MIL, BON, DAU, MOR et SAN).

Pour mettre en évidence une reconnaissance de la BSA-AT, nous avons développé un test Elisa (même protocole que dans le chapitre précédent, partie expérimentale 6.7, p. 74) dans lequel les puits ont été

sensibilisés avec de la BSA-AT et les puits témoins par une quantité équivalente de protéine porteuse (BSA ou BSA-SCH_2CONH_2, voir p. 31).

4.2. Résultats.

4.2.1. Mise en évidence d'une reconnaissance de la BSA-AT par le sérum KUT.

Le sérum KUT a été dilué de 2 en 2, du 1/50ième au 1/12800ième. La quantité de BSA-AT est de 20 pmol d'AT couplé à la BSA/puits ; la BSA a été utilisée dans les puits témoins. Au 1/50ième, le sérum KUT donne un signal de 1,67 unité de D.O., signal qui décroît régulièrement au fur et à mesure des dilutions (l'absence de courbe sigmoïde ne permet pas d'estimer un titre à cette reconnaissance). Parallèlement un signal important est trouvé dans les puits témoins (figure 21) qui est en moyenne 4 fois inférieur à celui trouvé dans les puits sensibilisés par la BSA-AT.

4.2.2. Etude des sérums témoins et des sérums des patients sous AT.

Tous les sérums ont été testés à une dilution fixée de 1/100ième ; les puits ont été sensibilisés par la BSA-AT (20 pmol d'AT couplé à la BSA /puits après calibration) et dans les puits témoins par soit par de la BSA, soit par de la BSA thiolée et bloquée par l'iodoacétamide (BSA-SCH_2CONH_2).

L'ensemble des résultats de cette expérience est présenté sur la figure 22. Les sérums des patients ayant reçu de l'AT, qu'ils soient ou non atteints d'une hépatite, donnent un signal intense avec la BSA-AT (0,97 ± 0,28 D.O.). Les sérums témoins donnent un signal environ 4 fois plus faible avec la BSA-AT (0,26 ± 0,13 D.O.). Il n'y a pas de différence importante (par comparaison avec la valeur de 0,97 précédemment citée) entre les réponses observées en présence de BSA ou de BSA-SCH_2CONH_2.

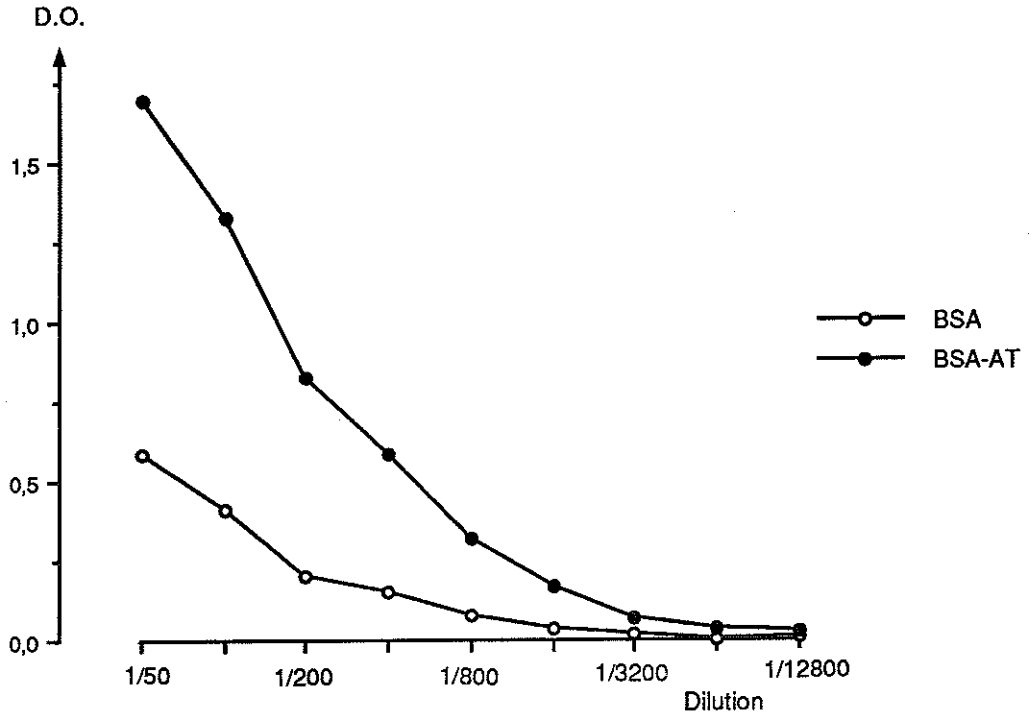


Figure 21 Réponse Elisa du sérum KUT contre la BSA-AT (•) et contre la BSA (○) en fonction de la dilution du sérum.

(les puits sont sensibilisés par 20 pmol d'AT couplé à la BSA (BSA-AT) par puits et par une quantité équivalente de BSA dans les puits témoins ; chaque mesure est effectuée en duplicat).

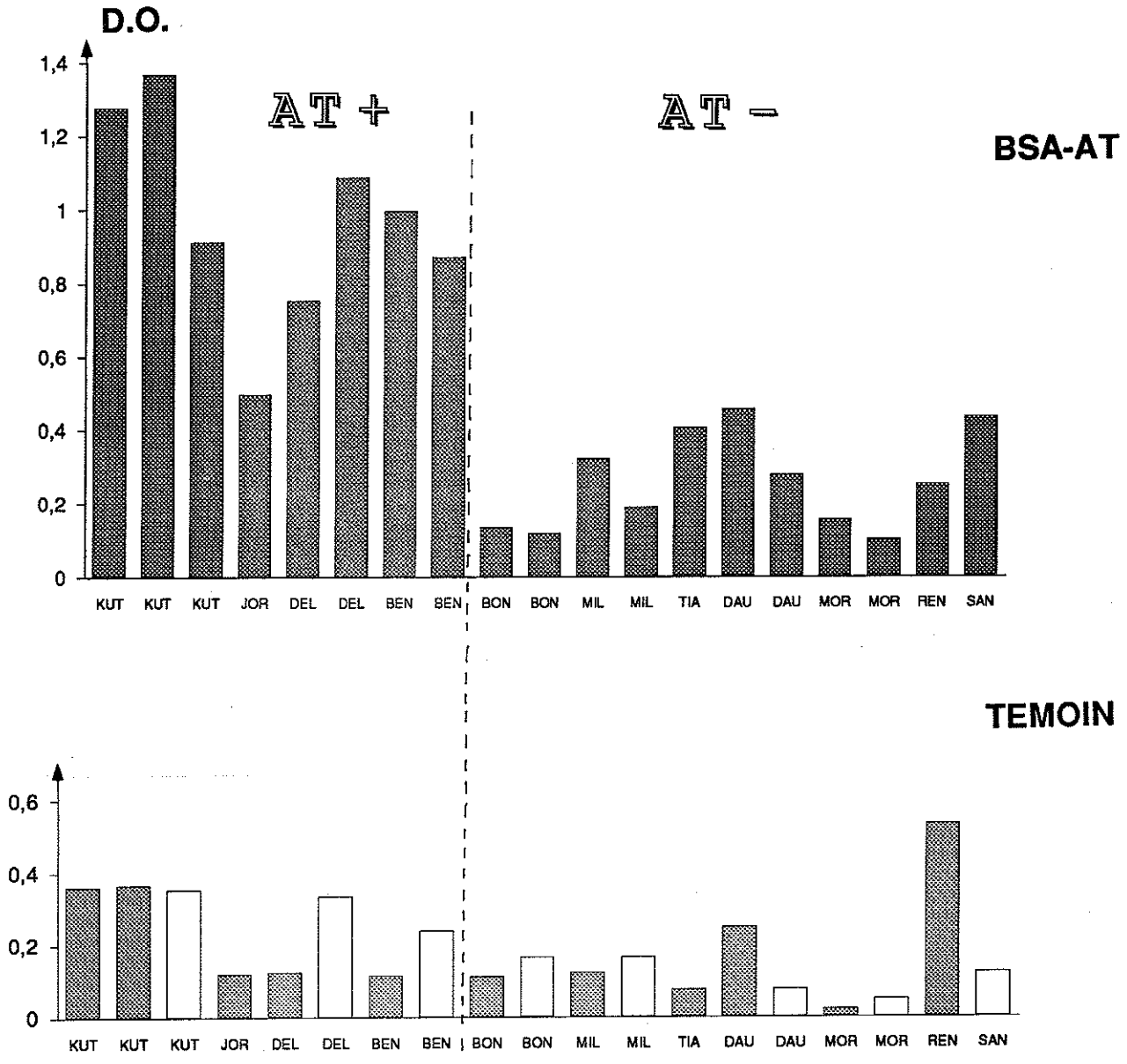


Figure 22 Réponse Elisa de l'ensemble des sérums testés. Sous forme de diagramme sont notées en haut les réponses obtenues contre la BSA-AT et en bas les réponses contre la BSA (en gris) ou contre la BSA-SCH_2CONH_2 (clair). Tous les sérums sont à la dilution de 1/100ième, les puits sont activés par 20 pmol d'AT couplé à la BSA ou par une quantité équivalente de protéines dans les puits témoins. Chaque mesure a été effectuée en duplicat.

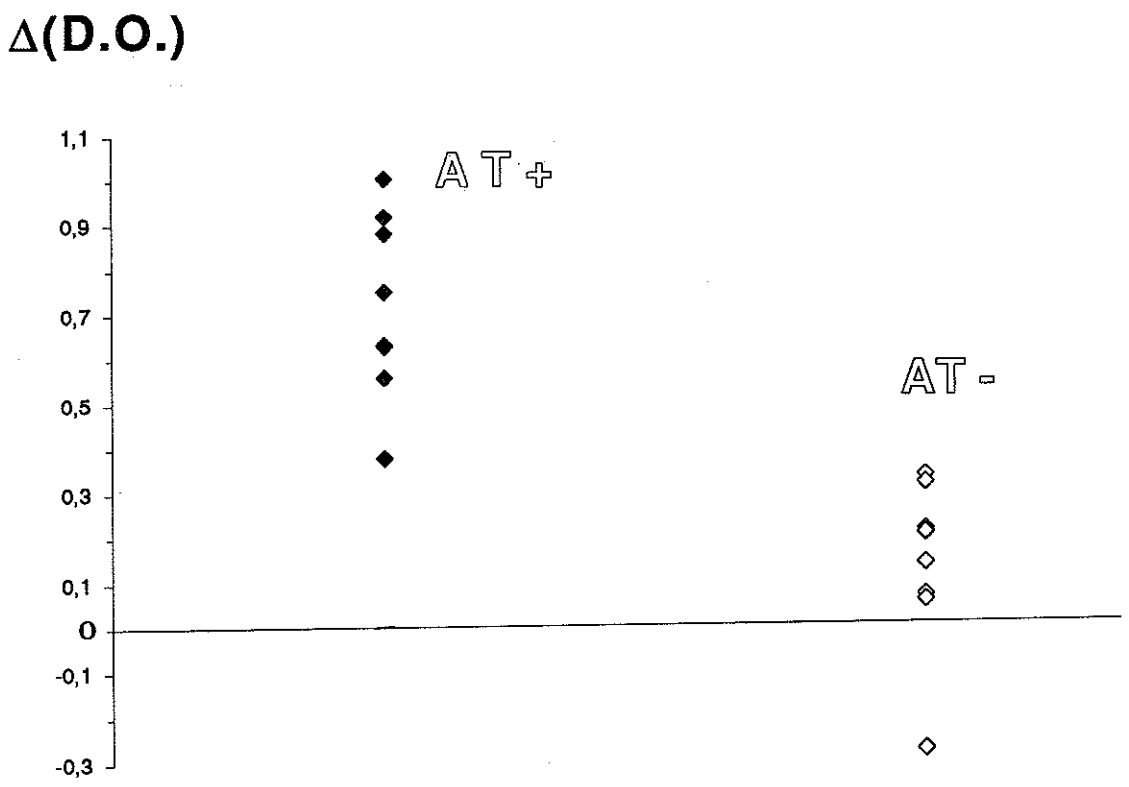


Figure 23 Réponse Elisa dirigée contre l'haptène AT substitué en 5 par un thioéther obtenue par différence entre la réponse contre la BSA-AT et celle contre la protéine témoin (mêmes conditions expérimentales que sur la figure 22) pour les sérums de patients ayant reçu de l'AT (à gauche) et pour les sérums des personnes témoins (à droite).

La différence entre les valeurs observées avec les puits sensibilisés par la BSA-AT et celles avec la BSA ou la BSA-SCH_2CONH_2 fournit le degré de reconnaissance du motif AT substitué en position 5 par un thiol. Pour l'ensemble des sérums des patients ayant reçu de l'AT (KUT, JOR, DEL et BEN), la valeur moyenne observée est de 0,72 ± 0,21 D.O., soit un valeur 6 fois plus élevée que celle obtenue avec les sérums témoins (0,11 ± 0,17 D.O.) (figure 23).

L'étude au cas par cas révèle 2 particularités. Premièrement le sérum JOR donne le signal le plus faible avec la BSA-AT. Il s'agit d'un patient ayant arrêté la prise d'AT 3 mois avant le prélèvement. Deuxièmement, le sérum KUT avec la BSA et les sérums KUT, DEL et BEN avec la BSA-SCH_2CONH_2 fournissent les valeurs les plus élevées de la série de mesure réalisée avec les protéines témoins. Autrement dit, le signal intense que nous observons avec les sérums de ces patients contre la BSA-AT et que nous sommes tentés d'attribuer à une reconnaissance du motif AT est aussi présent, certe beaucoup plus faiblement, avec les protéines témoins qui ne possèdent pas un tel motif.

4.2.3. Influence de la dialyse des sérums sur le test Elisa.

La présence d'AT dans les sérums des patients prélevés en cours de traitement par l'AT pourrait agir par inhibition compétitive sur la reconnaissance de la BSA-AT. Nous avons dialysé le sérum KUT ainsi qu'un sérum témoin pour étudier cette hypothèse (partie expérimentale 6.8, p. 77). Lors de la réalisation des tests Elisa, les sérums ont été dilués au 1/200ième et les puits sensibilisés par 20 pmol d'AT couplé à la BSA (BSA-AT) et une quantité équivalente de BSA dans les puits témoins.

Sur 4 mesures, le sérum KUT donne un signal de 0,73 ± 0,16 D.O. avec la BSA-AT contre 0,02 ± 0,02 D.O. avec la BSA. Le sérum témoin donne 0,07 ± 0,01 D.O. avec la BSA-AT contre 0,002 ± 0,002 D.O. avec la BSA. L'influence de la dialyse est donc, non pas une augmentation de la reconnaissance de la BSA-AT par le sérum KUT, mais une diminution importante de la valeur des tests témoins qui sont reconnaissance de la BSA par KUT et reconnaissance de la BSA-AT ou de la BSA par le sérum témoin.

4.2.4. Inhibition en présence d'AT.

Nous avons étudié l'influence de différentes concentrations d'AT sur la reconnaissance de la BSA-AT par le sérum KUT (BSA-AT 20 pmol d'AT couplé/puits, BSA comme témoin, KUT 1/100ième, AT entre 1 µM et 1 mM). Il n'y a pas d'inhibition entre 1 µM et 10 µM d'AT. Avec 100 µM, on observe une légère inhibition de 8% qui augmente à 20% en présence d'AT 1 mM.

4.3. Discussion.

Pour mettre en évidence la présence d'anticorps anti-médicament dans le sérum de patients atteints d'hépatite induite par la prise d'AT, nous avons développé un test Elisa de reconnaissance d'un motif chimique dérivé de l'AT qui pourrait ressembler à la structure des métabolites de l'AT fixé de manière covalente sur les protéines hépatiques après activation métabolique réalisée par les cytochromes P-450.

Tous les sérums de personnes ayant reçu de l'AT (depuis au moins 1 an) ou de patients atteints d'hépatite reconnaissent de manière intense et reproductible la BSA-AT. Ce résultat est en faveur de <u>l'apparition systématique d'anticorps anti-médicament</u> consécutive à la prise d'AT. Toutefois, un certain nombre d'éléments tempère ces résultats préliminaires :

1 - le panel des sérums positifs est en nombre insuffisant avec seulement 2 sérums de malades et 2 sérums de patients traités par l'AT ;
2 - le test est de mauvaise qualité avec une fixation non spécifique sur la BSA importante,
3 - et en particulier une fixation non négligeable des sérums positifs sur la BSA ou la BSA-SCH_2CONH_2.

Dans une certaine mesure, le signal intense que nous obtenons avec la BSA-AT et que nous attribuons à la présence d'anticorps anti-médicament est aussi présent, certes beaucoup faiblement, sur les protéines témoins.

Sur l'ensemble des tests, la différence entre la fixation sur la BSA-AT et la fixation sur les protéines témoins est 6 fois plus importante pour les sérums positifs que pour les sérums témoins. Compte tenu de ce résultat préliminaire, *la présence d'Ac anti-médicament paraît fort probable chez les personnes prenant de l'AT*. Ces anticorps, s'ils existent, ont une faible affinité pour l'haptène présenté et aussi probablement pour l'AT, ce qui explique la faible inhibition du test Elisa en présence d'AT.

Dans l'avenir, plusieurs directions de recherches nous permettrons de confirmer l'existence de ces anticorps anti-médicament :
1 - <u>Amélioration du test Elisa de reconnaisance de la BSA-AT</u> : amélioration de la protéine porteuse (trouver une protéine avec une fixation négligeable des sérums témoins), amélioration de l'haptène (fixation sur la protéine porteuse d'un motif dérivé de l'AT ayant un bon pouvoir inhibiteur dans le précédent test Elisa), amélioration du test Elisa (par exemple utilisation de sérum fœtal en plus de la gélatine pour diminuer la fixation non-spécifique, adsorption au préalable des sérums à tester sur de la BSA ou encore dialyse

systématique qui semble diminuer de manière très importante le bruit de fond bien que le facteur dialysable reste mystérieux).

2 - Développer un modèle animal : si l'apparition d'Ac anti-médicament au cours d'un traitement par l'AT est systématique chez l'homme, il pourrait en être de même chez le rat. Dans un tel modèle, les témoins seront facile de réalisation.

3 - Développer un nouveau test Elisa : la présence concomitante d'Ac anti-LKM2 et d'Ac anti-médicament dans les sérums de patients atteints d'hépatite est un obstacle majeur pour la réalisation d'un test Elisa de reconnaissance de métabolites fixés sur des microsomes. Comment de fait peut-on distinguer ce qui se fixe sur les P-450 (Ac anti-LKM2) de ce qui se fixe sur les métabolites (Ac anti-médicament) ? Par contre, si les patients sous AT et non atteints d'hépatite développent une réponse anti-médicament, il devient possible de la détecter dans un tel test puisqu'ils n'ont pas d'Ac anti-LKM2. En particulier, les sérums des patients DEL et BEN *devraient répondre positivement dans le test Elisa présenté dans le chapitre III.*

CHAPITRE VI

CONCLUSION

Des enzymes ont été impliquées récemment en tant que marqueur autoantigénique relativement spécifique de certaines maladies autoimmunes (voir introduction). Une des étapes clés à l'origine de la réponse autoimmune pourrait être la formation de néoantigènes après activation métabolique de composés exogènes ou endogènes par ces enzymes. Pour illustrer cette hypothèse, des protéines alkylées par des métabolites de médicaments ont été décrites dans des maladies autoimmunes d'origine médicamenteuse. En particulier, on a décrit des cas où l'enzyme qui métabolise serait lui-même l'autoantigène. Ce type de pathologie constitue donc un modèle où le facteur environnemental est bien défini.

Nous nous sommes intéressés à l'hépatite secondaire à la prise d'acide tiénilique. Pour préciser le rôle des néoantigènes dans ce modèle, notre projet de recherche se proposait de construire un haptène analogue aux métabolites de l'AT fixés de façon covalente aux protéines hépatiques. Cette protéine modifiée pouvait nous servir premièrement à envisager une immunisation chez le lapin et ainsi obtenir des Ac anti-AT qui nous servirons d'outil pour étudier la nature et l'apparition des néoantigènes *in vitro* et *in vivo*. Deuxièmement nous pouvions espérer, grâce à cette protéine modifiée, détecter une éventuelle présence d'Ac anti-médicament dans les sérums des patients malades. Ces anticorps seraient le reflet d'une réaction du système immunitaire contre le médicament lui-même.

Le choix de l'haptène s'est porté sur une substitution par un thiol en position 5 du noyau thiophène de l'AT respectant ainsi le fait que l'activation métabolique de l'AT se fait au niveau de ce noyau et que le probable sulfoxyde d'AT résultant doit réagir avec le thiol d'un résidu cystéinyle. Un tel couplage respecte la partie céto-dichloro-phénoxyacétique de la molécule dont on connaît la conservation au cours du métabolisme de l'isomère de l'AT (TAI) réalisée par les mêmes enzymes. La méthode de couplage au SPDP imaginée nous a fourni avec un bon rendement une BSA substituée par 10 à 20 molécules d'AT via un bras pontant de 4 atomes terminé par un thioéther substituant le noyau thiophène effectivement en 5. Cette protéine (BSA-AT) est immunogène chez le lapin et les anticorps obtenus reconnaissent spécifiquement par Elisa des protéines microsomales issues d'incubations en présence d'AT et d'un système générateur de NADPH. Nous avons sélectionné le lapin qui donne les sérums ayant les meilleurs titres en Ac anti-AT. Sur la fraction des immunoglobulines nous avons déterminé par des expériences d'inhibition au moyen d'analogues de structure de l'AT qu'il s'agit essentiellement de la partie céto-dichloro-phénoxyacétique qui est reconnue. Il semble légitime de penser que nos Ac seront capables de reconnaître l'ensemble des métabolites de l'AT qui doivent posséder ce fragment.

A l'avenir ces Ac anti-AT pourront être utilisés par immunotransfert pour mettre en évidence les néoantigènes formés soit *in vitro* au cours d'incubations de protéines microsomales, soit *in vivo* chez le rat dans les différentes fractions membranaires hépatiques. Par immunoaffinité, après fragmentation des néoantigènes, nous pouvons espérer purifier rapidement les peptides alkylés et ainsi déterminer les séquences protéiques impliquées.

La recherche d'anticorps anti-médicament montre effectivement une reconnaissance importante par Elisa de la BSA-AT par les sérums de patients at-

teints d'hépatite secondaire à la prise d'AT. Cette reconnaissance est aussi présente avec les sérums de personnes traitées par l'AT. Ce résultat est en faveur de l'apparition systématique d'Ac anti-médicament chez les personnes prenant de l'AT. Toutefois la mauvaise qualité des expériences témoins ne nous permet pas de conclure définitivement sur l'existence de ces anticorps. Malgré le caractère préliminaire de ce résultat, nous pouvons nous interroger sur sa signification. Compte tenu de nos connaissances sur le métabolisme de l'AT, il semblerait logique que ces anticorps proviennent d'un réaction immunitaire contre les métabolites de l'AT fixés de manière covalente aux protéines hépatiques. Pour justement entraîner une reponse immunitaire, ces néoantigènes doivent être découpés en peptides et être présentés aux cellules immunitaires par les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité 1 (ou 2) (CMH). Cette remarque nous amène à une première question, à savoir quel est le rôle des métabolites de l'AT dans la présentation de peptides par les molécules du CMH ? Autrement dit, les peptides intéressés sont-ils spontanément pris en charge par ce système ou au contraire ce n'est qu'après alkylation qu'ils peuvent interagir ? De même, la présentation par les molécules du CMH de peptides alkylés est-elle largement répandue au sein des médicaments responsables d'une réaction de fixation covalente aux protéines ou au contraire s'agit-il d'une singularité de certaines molécules commme l'AT ? *La présentation de peptides alkylés est-elle un facteur prédictif d'un effet secondaire autoimmun ?*

Deuxième interrogation plus proche de nous ; on peut se demander si les peptides alkylés présentés ne proviennent pas des P-450 eux-mêmes dont on connaît l'alkylation, du moins *in vitro* ? Quels sont les rapports entre la ou les séquences alkylées du P-450 et la ou les séquences reconnues par les anticorps anti-LKM2 ? C'est à l'évidence notre prochain objectif et nous avons maintenant les moyens d'y parvenir !

CHAPITRE V

PARTIE EXPERIMENTALE

6.1. Produits chimiques.

L'origine des produits chimiques est précisée dans le tableau 8.

6.2. Synthèse de la BSA-AT par la méthode au SPDP.

6.2.1. Thiolation de la BSA.

Dans un ballon, on mélange successivement 3 ml de tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,5, dégazé sous argon, 33 mg de BSA puis 300 µl, goutte à goutte, d'une solution méthanolique de SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, 4,65 mg soit 30 équivalents par rapport à la BSA). Après 60 min. à température ambiante, en atmosphère neutre et sous agitation douce, on ajoute 1,1 ml d'une solution de DTT 100 mM et on laisse à nouveau réagir pendant 60 min. La BSA thiolée est alors purifiée sur une colonne (IBF 16G400, Ø 2 cm, 2 ml/min) contenant un gel de trisacryl GF05M élué par du tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 5, dégazé sous argon, NaCl 100 mM et DTT 0,1 mM. La protéine sort dans la fraction de tête (10 min.) sous un volume de 18 ml. Les thiols sont alors dosés par le réactif d'Ellman [49] avec le tampon d'élution comme référence et la concentration de BSA est mesurée par son absorption dans l'U.V. à 278 nm (A_{278} = 0,63 unité de D.O. pour une solution de BSA à 1 mg/ml). On trouve 32 thiols par molécule de BSA, soit une fixation quantitative du SPDP.

Tableau 8 Origine des produits chimiques.

Produit chimique		origine
3		Amphar-Rolland
8, 9, 14		[44]
12 et [$O^{14}CH_2$] 12 (25 µCi/µmol]		Amersham
13, 5		P. Dansette (URA 400)
16		Amphar-Rolland
2-Acétyl-5-chlorothiophène		Aldrich
Acide azino-2-2' di(éthyl-3' benzthiazoline sulfonique (ABTS)		Sigma
Acide chlorhydrique 9,46N		Merck
Acide 2,3-dichlorophénoxyacétique		Janssen
Acide éthacrynique		Sigma
Acide tiénilique	AT	Amphar-Rolland
	[$O^{14}CH_2$]AT (43 µCi/µmol)	CEA-URA400
Adjuvants de Freund		Sigma
Agar noble		Difco
DETAPAC		Sigma
Dithiotréitol		Sigma
Isomère de l'AT	TAI	Amphar-Rolland
	[$^{14}COAr$]TAI (25 µCi/µmol)	Amphar-Rolland
Iodoacétamide		Merck
Glucose-6-phosphate déshydrogénase		Boehringer-mannhein
Merthiolate (thimérosal)		Sigma
Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate oxydé (NADP)		Boehringer-mannhein
N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate		Sigma
PEG (polyéthylèneglycol) 4000		Prolabo
2-thiényl-4-méthoxyphénylcétone		Ega-chemie
Trizma-base		Sigma
Tween 20		Merck
Véronal		Sigma

Les autres produits chimiques utilisés sont de la meilleure qualité commercialement disponible.

6.2.2. Couplage avec l'acide 5-chloro-tiénilique 12.

Le pH de la fraction contenant la BSA thiolée est amené à 9,3 au moyen de K_2CO_3. Après addition d'un ml d'une solution aqueuse de **12** 20 mM (0,2 µCi/µmol), le milieu réactionnel est agité doucement à l'abri de la lumière. Au troisième jour le pH est monté à 10,3 et la température à 40°C ; au huitième, une anaérobiose stricte est obtenue par surpression d'argon, la réaction est arrêtée au quatorzième jour. Le nombre de molécules d'acide tiénilique fixées par molécule de BSA est mesuré régulièrement sur des aliquotes par précipitation des protéines en milieu acide sur filtre Whatman et comptage de la radioactivité retenue après 3 lavages de 10 min. dans des bains de méthanol et un lavage de 10 min. dans un bain d'acétate d'éthyle (les filtres sont séchés à l'air libre puis déposés dans une fiole de propylène avant comptage au moyen d'un compteur à scintillation Packard Tri-carb 4500 corrigé de l'extinction par étalonnage externe après addition de 3 ml de toluène scintillant de chez Packard). En fin de réaction, le pH est redescendu à 7 au moyen d'acide acétique et la BSA-AT est purifiée sur la même colonne éluée par un tampon acétate de sodium 100 mM pH 5,5. Le pH de la fraction qui contient les protéines est amené à 10 (Trizma, Sigma) ; on ajoute alors de l'iodoacétamide 3 mM. Après 30 min. à 40°C, on lave les protéines par deux fois 30 volumes de tampon acétate de sodium 100 mM pH 5,5 après concentrations successives par ultrafiltration (Système Aminko, membrane d'exclusion à 30000 Daltons). Après lyophylisation, on récupère 13 mg de BSA-AT avec un rendement de 40% par rapport à la BSA initiale. Il existe une deuxième fraction qui sort au temps d'élution de 60 min. contenant également des protéines mais qui ne sont pas retenues par la membrane d'ultrafiltration, il s'agit donc de peptides issus de coupures de la BSA.

6.3. Protocole d'immunisation, obtention des sérums et de la fraction des immunoglobulines.

Le protocole et les techniques employés pour cette immunisation sont usuels [52, 53].

6.3.1. Immunisation.

Une solution dans du sérum physiologique de BSA-AT est émulsionnée avec un même volume d'adjuvant de Freund avant d'être administrée en de multiples points d'injection sous-cutanée au flanc de chaque lapin. La première injection contient 500 µg de BSA-AT et de l'adjuvant complet, les rappels sont effectués tous les deux mois avec de l'adjuvant incomplet et 500 µg de BSA-AT pour le premier rappel puis 100 µg pour les suivants. A partir du deuxième rappel, le sang est collecté 10 à 15 jours après l'injection (respectivement 10, 14, 12 et 14 jours pour les prélèvements I à IV).

6.3.2. Réalisation des prélèvements et préparation des sérums.

Le revêtement cutané de l'oreille est désinfecté au moyen d'alcool à 70°. La veine externe est vasodilatée par du toluène appliqué avec un morceau de coton puis sectionnée franchement au moyen d'une lame de bistouri. 40 à 50 ml de sang sont collectés par lapin. Les prélèvements sont ensuite incubés 60 min. à 37°C puis une nuit à 4°C. Les sérums sont séparés des coagulums et conservés par congélation à -20°C.

6.3.4. Obtention de la fraction des immunoglobulines du lapin 2.

Les immunoglobulines sont fractionnées en une étape par précipitation au sulfate d'ammonium [54]. A 60 ml de sérum du lapin 2 (prélèvements II, III et IV), on additionne 40 ml de tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM (PBS) puis, goutte à goutte, 133 ml d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. La précipitation s'achève à 4°C en 10 min. Le précipité est centrifugé 20 min. à 3000 g puis repris par 100 ml d'une solution de sulfate d'ammonium à 40% de saturation. Après un deuxième lavage par 50 ml de cette solution, la fraction des immunoglobulines est remise en solution dans 30 ml de PBS puis dialysée pendant 24 heures contre du PBS. On récupère les immunoglobulines dans un volume de 60 ml que l'on ajuste par ultrafiltration à un volume moitié du volume de sérum initial soit 30 ml. Le dosage des protéines selon la méthode de Lowry [55] est de 40,6 mg/ml, soit le chiffre habituel de 20 g Ig/l de sérum. 4 ml de cette préparation ont été conservés à 4°C en présence d'azoture de sodium (10 mM) puis utilisés pour l'étude de la réponse anti-AT ; le reste a été congelé.

6.4. Technique de double diffusion sur gel d'agarose (Ouchterlony).

Sur une plaque de Gel-bond disposée sur une table mise à niveau, on coule un gel d'agar 125x125x1,5 mm (soit 23 ml) tamponné par du véronal à pH 7,4 de composition donnée dans le tableau 9. Dès qu'il est solidifié, on creuse 6 séries de 12 puits au moyen d'une empreinte : puits de 3 mm de diamètre distants des plus proches voisins de 5 mm selon un maillage hexagonal (figure 15, p. 34). Dans les puits externes sont déposés 8 µl des différents sérums à tester et dans les 2 puits centraux 8 µl soit d'une solution de BSA-AT (dans du PBS), soit de BSA. Après une nuit

d'incubation à 4°C sous atmosphère saturée en vapeur d'eau, les gels sont lavés dans du sérum physiologique (2x60 min.). L'eau du gel est ensuite absorbée par plusieurs épaisseurs de papier filtre (5 x Wattman 3mm) disposées sur le gel et maintenues sous pression. Après séchage complet au sèche-cheveux, les arcs de précipitation sont révélés au bleu de Coomassie (solution colorante : $MeOH/CH_3COOH/H_2O$ 5/1/5 v/v plus quelques grammes de bleu de Coomassie (≠ 5 g/l), solution décolorante : idem sans le bleu, la coloration est réversible).

Tableau 9 Composition des gels d'agar utilisés dans la technique de double-diffusion.

Pour 200 ml d'eau :	
Véronal 60 mM	2430 mg
(tampon Sigma, pH ajusté par HCl)	
Merthiolate 0,01%	20 mg
Agar noble 1,25% (Difco)	2500 mg
PEG 4000 2%	4000 mg

6.5. Mesure de l'affinité des anticorps anti-AT par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium.

Selon la méthodologie décrite dans la littérature [50], on mélange, dans des tubes Eppendorf de 400 µl, 10 µl de sérum avec 40 µl de solution de TAI (25 µCi/µmol) dans du PBS dans une gamme de concentrations de 1,25 à 17,5 µM. Au bout de 60 min. à 4°C, on additionne 50 µl d'une solution

de sulfate d'ammonium saturée à température ambiante. Après précipitation des Ig et centrifugation 3 min. à 14000 g, le culot est lavé 2 fois par 100 µl d'une solution de sulfate d'ammonium à 50% de la saturation à 4°C. Le culot est ensuite remis en solution dans du PBS et la radioactivité retenue comptée. La fixation non-spécifique du TAI sur les Ig est mesurée à partir d'expériences analogues réalisées avec les sérums préimmuns (prélèvement 0). Chaque mesure est réalisée en duplicat.

6.6. Préparation des métabolites du TAI ou de l'AT fixés aux protéines microsomales.

6.6.1. Origine des animaux.

Il s'agit de rats mâles de souche Sprague Dawley (Iffa Credo) pesant environ 200 g. Après une période d'acclimatation de 10 jours (température constante de 24°C, éclairement nychtéméral, nourriture (AO4 de chez UAR) et eau *ad libitum*), un protocole d'induction spécifique de 3 jours est institué. Après une dernière nuit de jeûne, les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale puis exsanguinés par section carotidienne. Le foie est immédiatement prélevé et la fraction microsomale préparée.

6.6.2. Protocole d'induction au clofibrate.

Quatre injections intrapéritonéales (i.p.) de clofibrate à partir d'une solution à 10% v/v dans l'huile de maïs (1 ml équivalent à 100 mg de clofibrate) selon le protocole suivant :

Jø.	18h.	250 mg/kg (i.p.)
J1.	10h - 18h. . . .	500 mg/kg (i.p.) en 2 injections
J2.	16h.	1000 mg/kg (i.p.)
J3.	10h.	†.

6.6.3. Préparation de la fraction microsomale de foie de rat.

5 ou 10 foies de rat ont été traités à chaque préparation. Le protocole employé est décrit sur la figure 24 ; l'étape de lavage au pyrophosphate permet l'élimination de l'hémoglobine [56]. La concentration en protéines microsomales a été mesurée selon la méthode de Lowry avec la sérumalbumine de bœuf comme standard [55]. Le dosage du contenu en cytochromes P-450 a été effectué selon la méthode de Omura et Sato [57] : après dilution choisie dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4, la suspension microsomale est répartie dans deux cuves à bords noirs limitant la diffusion de la lumière. On réduit les hémoprotéines par addition de quelques grains de dithionite de sodium puis la cuve échantillon est saturée en monoxyde de carbone par barbotage. La bande d'absorption à 450 nm du complexe P-450-CO est alors mesurée par spectrophotométrie d'absorption différentielle sur un spectrophotomètre KONTRON 820 ($\varepsilon_{450-490}$ = 91 $cm^{-1}.mM^{-1}$).

Les caractéristiques des deux préparations sont pour le premier lot de 5 rats induits par le clofibrate : 1,61 nmol de P-450/mg de protéine et 0,49 nmol de cytochrome b5/mg de protéine et pour le deuxième lot de 10 rats 1,40 nmol de P-450/mg de protéine et 0,41 nmol de cytochrome b5/mg de protéine.

6.6.4. Réalisation des incubations.

Les incubations de volume 5 ou 10 ml sont réalisées par mélange à 4°C, dans un tampon phosphate de sodium (0.1 M, DETAPAC 1 mM, pH 7.4), de microsomes fraîchement décongelés à la concentration en P-450 de 1 µM et de substrat (AT ou TAI 100 µM à partir d'une solution aqueuse 5 mM). Après préincubation de 3 min. à 37°C sous agitation, la réaction est

Perfusion du foie jusqu'à décoloration
au moyen de sérum physiologique
Découpage en dés dans du tampon sucrose
(sucrose 0,2 M, Tris 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,4, 4°C)

↓

Homogénéisation par appareil de Potter - Elvejhem
(20 à 40 g de foie pour 100 ml de tampon sucrose)
Centrifugation 5 min. 800 g puis 20 min. 13500 g

↓

Centrifugation du surnageant 60 min. 100 000 g
(précipitation microsomes et glycogène)

↓

Homogénéisation du culot dans tampon
pyrophosphate de sodium 100 mM pH 7,4
Centrifugation 30 min. 100 000g

↓

Homogénéisation du culot dans du tampon phosphate
de sodium 100 mM, glycérol 20%, pH 7,4
Congélation dans l'azote liquide
Conservation à -80°C

Figure 24 Préparation de la fraction microsomale de foie de rat. Toutes les manipulations sont effectuées à 4°C, le contenu en cytochrome b5 est immédiatement dosé ($\epsilon_{427 - 410}$ = 181 $cm^{-1}.mM^{-1}$ sur seule réduction de la cuve échantillon), puis celui en cytochrome P-450 ($\epsilon_{450 - 490}$ = 91 $cm^{-1}.mM^{-1}$)

démarrée par l'addition du système générateur de NADPH (glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) 2 U/ml, glucose-6-phosphate (G6P) 10 mM et NADP 1 mM). Le système générateur de NADPH, obtenu par mélange d'une solution de G6PDH à 100 U/ml et d'une solution de G6P à 200 mM et NADP à 20 mM dans des proportions 2/5 v/v, est également préincubé 3 min. afin de réduire le NADP en NADPH. Le milieu réactionnel est agité vivement pendant 20 minutes à 37°C en présence de l'oxygène de l'air. Les incubations témoins sont réalisées en l'absence de système générateur de NADPH (remplacé par du tampon phosphate pH 7,4).

En fin d'incubation, la réaction est arrêtée par de l'HCl 2N. Après une heure d'incubation à 37°C, les protéines sont centrifugées 30 min. à 700 g dans des tubes en polypropylène. Le culot est ensuite lavé 3 fois par 20 ml de méthanol (lavages alternés par des centrifugations de 15 min. à 10000 g dans des tubes en polycarbonate). Le culot est alors dissous dans de la soude 0,1N (moitié du volume de l'incubation initiale) par sonication à 75 Watts 0,5 s/s à 0°C pendant 10 min. (la solution dans la soude des protéines issues des incubations d'AT présentent une couleur jaune). Deux aliquotes sont prélevés pour le dosage des protéines et du taux de fixation covalente avant dilution choisie dans du tampon de sensibilisation pH 9,5 de l'Elisa et congélation immédiate. Le dosage de la radioactivité donne des valeurs attendues (19,25 et 18,8 nmol TAI/nmol P-450 et 3,5 nmol AT/nmol P-450) avec une absence de fixation sur les protéines des incubations de référence (0,12 (TAI) et 0,13 (AT) nmol/nmol P-450). Le dosage des protéines, que se soit par la méthode de Lowry [55] ou la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA-kit, Pierce), ne retrouve que 60% des protéines attendues. Il semble que ce phénomène apparaisse à la suite du traitement par HCl et ne serait pas dû à une perte des protéines au cours des différents lavages

100 µl tampon de sensibilisation + antigène

. 60 min. 37°C et/ou 16 heures à 4°C
. 1 lavage PBS

↓

100 µl gélatine 0,5% dans PBS

. 30 min. 37°C
. 3 lavages PBS-tween

↓

100 µl PBS-tween-gélatine + sérum

. 120 min. 37°C ou 16 heures 4°C
. 5 lavages PBS-tween

↓

100 µl Anticorps anti-lapin marqués à la peroxydase (Dakopatts P217 1/500è) dans PBS-tween-gélatine

. 60 min. 37°C
. 5 lavages PBS-tween

↓

100 µl solution révélation

. 20 min. 37°C
. arrêt par refroidissement à 0°C

↓

Lecture à 490 nm

PROTOCOLE ELISA

PBS tampon phosphate pH 7,4 salin
pour 1000 ml, 100 ml tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4,
8,7 g de NaCl, compléter à 1 l par de l'eau pure.

PBS-tween 0,1%
tween 20 1 ml pour 1000 ml de PBS

Gélatine 5%
25 g de gélatine alimentaire dissous à chaud dans 500 ml d'eau pure,
réchauffage au four à microondes avant emploi.

PBS-gélatine-(tween)
gélatine 5% 1 ml à compléter à 10 ml par du PBS-(tween)

Tampon de sensibilisation pH 9,5 (bicarbonate 0,05 M)
dans 1 l d'eau pure :

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
NaN_3	0,2 g

Solution de révélation
(préparée immédiatement avant emploi)

ABTS (Sigma)	20 mg
H_2O_2 30%	20 µl
tampon citrate pH 5,6	25 ml

Tampon citrate pH 5,6

Na_2HPO_4	20,6 g
Ac. citrique	4,45 g
eau pure	500 ml

ajuster le pH par HCl concentré

Figure 25 Protocole des tests Elisa avec la composition des solutions employées (les sels proviennent de chez Merck). (N.B. il semble à postériori que la concentration en eau oxygénée soit environ trois fois trop élevée avec pour conséquence une diminution de l'intensité du signal de l'Elisa)

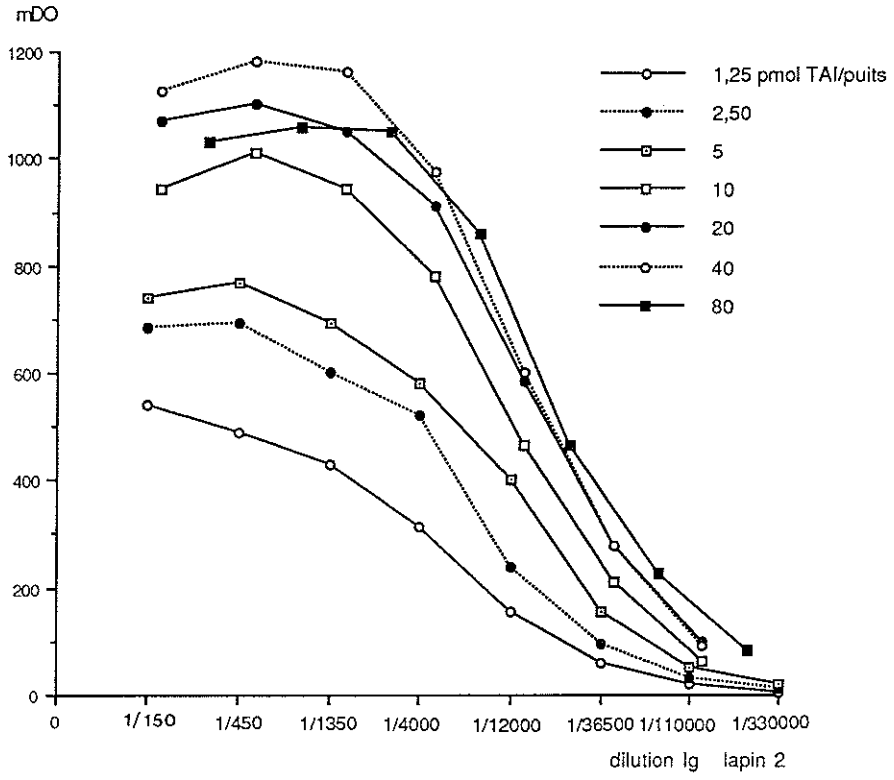


Figure 26 Calibrage de la sensibilisation des plaques Elisa par les protéines microsomales contenant des métabolites du TAI fixés de façon covalente (chaque mesure est corrigée par la valeur du puits témoin et est effectuée en duplicat).

utilisés à la dilution recommandée par le fabricant (Dakopatts P217 au 1/500ième) et la révélation à l'ABTS standardisée sur 20 min. à 37°C.

Pour les métabolites du TAI fixés, le meilleur signal est obtenu avec 20 pmol/puits avec une DOmax de 1,1, 20 fois supérieure au signal du blanc, et un titre de 1/16000ième. Pour les métabolites de l'AT, le meilleur signal est obtenu avec 10 pmol/puit avec une DOmax de 1,0, 10 fois supérieure au blanc, et un titre de 1/9000ième.

6.8. Dialyse des sérums.

Le sérum KUT et un sérum témoin sont dialysés contre du PBS selon le protocole suivant : 200 µl de chaque sérum sont centrifugés à 14000 g 5 min. et le surnageant récupéré. Les culots sont lavés 2 fois et les surnageants récupérés. Les différents surnageants sont réunis pour chacun des sérums, complétés à 2 ml par du PBS et ensuite dialysés contre 4 fois 2 litres de PBS sur 2 jours à 4°C. On complète à un volume final de 4 ml (correspondant à une dilution des sérums au 1/20ième). On ajoute de l'azoture de sodium 1 mg/ml avant conservation à 4°C.

6.9. Origine et synthèse des inhibiteurs.

6.9.1. Origine des inhibiteurs.

Les composés **19**, **17** et **15** ont été synthétisés au laboratoire (voir ci-dessous), l'origine des autres inhibiteurs est précisée dans le tableau 8 (p. 65), **8** et **9** ont été repurifiés par H.P.L.C. avant leur utilisation afin d'éliminer toute trace de TAI éventuellement apparue par décomposition.

6.9.2. Techniques spectroscopiques.

Pour l'étude de la R.M.N.^{1}H les échantillons purifiés par H.P.L.C. sont lyophilisés et repris par 0,3 ml de solvant deutérié (DMSO-D_6 100%, CD_2Cl_2,$CDCl_3$ 100% sur carbonate de potassium...). Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre 250 MHz (Brucker WM 250). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en p.p.m. par rapport au signal du tétraméthylsilane $Si(CH_3)_4$.

Les spectres d'absorption U.V.-visible sont enregistrés sur un appareil KONTRON 820. Les spectres de masse sont obtenus sur un appareil NERMAG R10-10 par impact électronique ou par ionisation chimique (NH_3). Les résultats sont exprimés en pourcentage du pic de base (100%) ; le terme Cl_2 indique la présence un fragment dichloré identifié par un triplet isotopique (M, M + 2, M + 4) dans un rapport 9/6/1 correspondant à la distribution naturelle des isotopes ^{35}Cl et ^{37}Cl.

6.9.3. Synthèse du 2-acétyl, 5-S-mercaptoéthanol-thiophène 19.

20 mg de 2-acétyl-5-chloro-thiophène en solution dans 2 ml de méthanol sont mis à réagir avec du mercaptoéthanol (100 µl). Une pincée de carbonate de potassium démarre la réaction qui est suivie pendant 300 min. à 50°C par chromatographie sur plaque de silice (éluant dichlorométhane). A coté du produit de départ (rf 0,7), apparaît un nouveau produit plus polaire (rf 0,25) qui se présente après purification sur plaque préparative de 1 mm d'épaisseur sous l'aspect d'un solide blanc (13,8 mg). Sa solution dans le dichlorométhane deutérié présente en R.M.N.^{1}H les caractéristiques attendues pour le produit **19**, soit deux protons vinyliques en doublet (J = 3,7 Hz) à 7,54 et 7,68 p.p.m., un acétyl en singulet (3H) à 2,48 p.p.m. et les 5 protons du résidu mercaptoéthanol en deux triplets (2H, J = 6 Hz) à 3,13 et

3,79 p.p.m. dont le plus déblindé est couplé avec un singulet élargi à 1,91 p.p.m., échangeable avec un deutérium de l'eau lourde correspondant au proton de la fonction alcool. La spectrométrie de masse en ionisation chimique (NH_3) est en accord avec cette structure de masse M égale à 202 (m/z (NH_3) : 203 (100%, M + H^+) et 220 (65%, M + NH_4^+).

6.9.4. Synthèse de l'acide dihydroéthacrynique 15.

117 mg d'acide éthacrynique en solution dans 2 ml de méthanol réagissent avec de l'hydrogène en surpression (80 cm d'eau) en présence de 11 mg de palladium (10% sur charbon). La réaction d'hydrogénation est suivie par chromatographie sur plaque de silice (solvant $MeOH/CH_3COOH$/acétate d'éthyle 1/1/9 v/v/v). Après 180 min. à température ambiante et agitation douce, l'acide éthacrynique (rf 0,7) s'est complétement transformé en un nouveau produit moins polaire migrant à la limite du front de solvant. La purification préparative sur plaque de silice de 1 mm (solvant : hexane/CH_2Cl_2/acétate d'éthyle/CH_3COOH 50/45/4/1 v/v/v/v, rf 0,5) conduit à une huile jaune. Sa solution dans le dichlorométhane deutérié présente en R.M.N.^{1}H les caractéristiques de l'ester de méthyle du produit attendu avec deux protons aromatiques à 7,27 (d, 9 Hz) et 6,79 p.p.m. (d, 9 Hz), le OCH_2 en singulet intégrant pour deux protons à 4,77 p.p.m., un acétyl en singulet 3H à 2,40 p.p.m., un doublet 3H à 0,91 p.p.m. (J = 3,5 Hz), un triplet 3H à 1,14 p.p.m. (J = 3,5 Hz), un quintuplet 1H à 3,17 p.p.m. (J = 3 Hz) et deux massifs 1H à 1,41 et 1,75 p.p.m. L'ester de méthyle est hydrolysé par la soude 0,5N dans le méthanol en 300 min. à température ambiante ; la réaction est totale (suivie par H.P.L.C.). On récupère 70 mg d'une poudre blanche (homogène par chromatographie sur plaque de silice), de maximun d'absorption U.V. à 264

nm et de spectre de masse en accord avec la structure recherchée **15** (m/z (NH_3) : 322 (100%, Cl_2, M + NH_4^+) et 305 (35%, Cl_2, M + H^+), 247 (40%, Cl_2, aroylium) et 264 (40%, Cl_2, aroylium + NH_3) avec M = 304).

6.9.5. Synthèse de 17.

Selon une méthode utilisée pour la synthèse de l'acide tiénilique [58], le produit **17** a été synthétisé en 2 étapes à partir du 2-thiényl-4-méthoxyphénylcétone **20** : le monochloracétate de sodium est condensé sur le sel de sodium du composé **21** obtenu par déméthylation de **20** par action du chlorure d'aluminium dans le benzène à reflux (synthèse selon [58], effectuée par Quang Nguyen N. au laboratoire ; R.M.N.^{1}H ($CDCl_3$) **21** : 1H 7,82 p.p.m. (dd 3-1,5 Hz), 1H 7,53 p.p.m. (dd 5-1,5 Hz), 1H 7,35 p.p.m. (dd 3-5 Hz), 1H 7,24 p.p.m. (s), 2H 7,30 p.p.m. (d 9 Hz) et 2H 6,84 p.p.m. (d 9 Hz) ; m/z (NH_3) : 205 (100%, M + H^+ avec M = 204) et 222 (15%, M + NH_4^+)).

A 2 ml de DMF anhydre sont successivement ajoutés 30 mg d'hydrure de sodium, 35 mg de **21** et 40 mg de monochloracétate de sodium. Après 1080 min. à 100°C, l'hydrure de sodium est détruit par de l'eau et les produits de la réaction extraits à l'éther après acidification (HCl). La purification sur plaque de silice (solvant toluène/acétate d'éthyle/CH_3COOH 15/60/5 v/v/v) conduit à coté du produit de départ (rf 0,63) à un nouveau produit (rf 0,31) qui est remis en solution dans de l'ammoniaque 0,1N. Après extraction d'impuretés provenant de la plaque de silice par l'acétate d'éthyle puis lyophilisation, on récupère avec 33% de rendement un produit pur qui répond aux caractéristiques attendues pour le produit **17** : spectre d'absorption U.V. superposable à celui de l'acide tiénilique de maximum à 310 nm, en R.M.N.^{1}H (DMSO-D_6) : 2H 7,79 p.p.m. (d 9 Hz), 2H 6,92 p.p.m. (d 9 Hz), 1H 8,04 p.p.m. (d 5 Hz), 1H 7,70 p.p.m. (d 5 Hz), 1H 7,26 p.p.m. (t 5

Hz) et OCH_2 4,67 p.p.m. (s) et en spectrométrie de masse : m/z (NH_3) : 263 (100%, M + H^+ avec M = 262) et 280 (65%, M + NH_4^+).

BIBLIOGRAPHIE

1 - Oldstone M.B.,
"*Molecular mimicry and autoimmune disease*",
Cell, **50**, 819, 1987 ;

2 - "*Enzymes as autoantigens*",
Lancet, **339**, 779, 1992 (Editorial) ;

3 - Beaune Ph., Dansette P.M., Mansuy D., Kiffel L., Finck M., Amar C., Leroux J.P., and Homberg J.C.,
"Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug",
Proc. Natl. Acad. Sci.,**84**, 551,1987 ;

4 - Krohn K., Uibo R., Aavik E., Peterson P. and Savilahti K.,
"*Identification by molecular cloning of an autoantigen associated with Addison's disease as steroid 17α-hydroxylase*",
Lancet, **339**, 770, 1992 ;

5 - Yeaman S.J.,
"Identification and analysis of the major antigens in the primary biliary cirrhosis",
Biochem. Soc. Trans., **19**, 196, 1991 ;

6 - Homberg J.C., Andre C., Abuaf N.,
"a new anti - liver - kidney - microsome antibody (anti - LKM2) in tienilic acid - induced hepatitis",
Clin. Exp. Imm., **55**, 561, 1984 ;

7 - Maddrey W.,
"Subdivivions of Idiopathic Autoimmune Chronic Active Hepatitis",
Hepatology, **7**, 1372, 1987 ;

8 - Waldenström J.L.,
"Blutproteine und Nahrungeisweiss",
Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr, **2**, 130, 1950 ;

9 - Fenton Schaffner M.D.,
"Autoimmune Chronic Active Hepatitis : Three Decades of Progress",
Progress in Liver Diseases, **8**, 485, 1986 ;

10 - Mackay I.R., Taff L.I. and Cowling D.C.,
"Lupoid Hepatitis",
Lancet, **2**, 1323, 1956 ;

11 - Homberg J.C. and col.,
"Chronic Active Hepatitis Associated with Antiliver/Kidney Microsome Antibody Type 1 : A Second Type of "Autoimmune" Hepatitis",
Hepatology, **7**, 1333, 1987 ;

12 - Calmus Y., Biour M., et Poupon R.,
"Les tests "in vitro" dans le diagnostic des hépatites médicamenteuses",
Gastroenterol. Clin. Biol., **11**, 586,1987 ;

13 - Pedersen J.S., Toh B.H., Mackay I.R.,
"Autoantibodies to cytoskeletal filaments actin and intermediate filaments segregate with two types of chronic active hepatitis",
Clin. Exp. Immunol., **48**, 527, 1982 ;

14 - Wächter B., Kyriatsoulis A., Lohse A.W., Gerken G., Meyer zum Büschenfelde K.-H. and Manns M.,
"Characterization of liver cytokeratin as a major target antigen of anti-SLA antibodies",
J. Hepatol., **11**, 232, 1990 ;

15 - Pons C.,
"Origine des anticorps anti-tissus apparaissant dans des hépatites médicamenteuses de type immuno-allergique",
Thèse de Doctorat d'Université Paris VII en toxicologie fondamentale et appliquée, Paris, 1989 ;

16 - Sacher M., Blümel P., Thaler H.and Manns M.,
"Chronic active hepatitis associated with vitiligo, nail dystrophy, alopecia and a new variant of LKM antibodies",
J. Hepatol., **10**, 364, 1990 ;

17 - Bourdi M., Larrey D., Nataf J., Bernuau J., Pessayre D., Iwasaki M., Guengerich F.P., Beaune P.H.,
"Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P-450IA2",
J. Clin. Invest., **85**, 1967, 1990 ;

18 - Meyer zum Büschenfelde K.H., Meyer U.A. and Eichelbaum M.,
"Patients with type II autoimmune hepatitis express functionally intact cytochrome P-450 that is inhibited by LKM-1 autoantibodies in vitro",
Hepatology, **12**, 127,1990 ;

19 - Kenna G.J.,
"The molecular basis of halothane-induced hepatitis",
Biochem. Soc. Trans., **19**, 191, 1991 ;

20 - Manns M., Johnson E.F., Griffin K.J., Tang E.M., and Sullivan K.F.,
"Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome db1",
J. Clin. Invest., **83**, 1066, 1989 ;

21 - Gueguen M., Yamamoto A.M., Bernard O., and Alvarez F.,
"Anti-liver kidney microsome antibody type I recognizes human cytochrome P450 db1",
Biochem. Biophys. Res. Commun., **159**, 542, 1989 ;

22 - Kiffel L., Loeper J., Homberg J.C., and Leroux J.P.,
"A human cytochrome P-450 is recognized by anti-liver/kidney microsome antibodies in autoimmune chronic hepatitis",
Biochem. Biophys. Res. Com., **159**, 283, 1989;

23 - Manns M., Zanger U., Gerken G., Sullivan K. F., Meyer zum Büschenfelde K.H., Meyer U.A. and Eichelbaum M.,
"Patients with type II autoimmune hepatitis express functionally intact cytochrome P-450 that is inhibited by LKM-1 autoantibodies in vitro",
Hepatology, **12**, 127,1990 ;

24 - Manns M., Griffin K., Sullivan K.F. and Johnson E.F.,
"LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P-450 IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase",
J. Clin. Invest., **88**, 1370,1991 ;

25 - Gueguen M., Boniface O., Bernard O., Clerc F., Cartwright T. and Alvarez F.,
"Identification of the main epitope on human cytochrome P450 IID6 recognized by anti-liver kidney microsome antibody",
J. Autoimm., **4**, 607,1991 ;

26 - Krawitt E.L., Kilby A.E., Albertini R.J., Schanfield M.S., Chastenay B.F., Harper P.C., Mickey R.M. and McAuliffe T.,
"Immunogenetic Studies of Autoimmune Chronic Active Hepatitis : HLA, Immunoglobulin Allotypes and Autoantibodies",
Hepatology, **7**, 1305, 1987 ;

27 - Manns M., Griffin K.J., Quattrochi L.C., Sacher M., Thaler H., Tukey R.H., and Johnson E.F.,
"Identification of Cytochrome P450 IA2 as a human autoantigen",
Arch. Biochem. Biophys., **280**, 229,1990 ;

28 - Gordon Gibson G. et Skett P.,
"Introduction to DRUG METABOLISM",
Chapman and Hall, London, 1986 ;

29 - Poulos T.L. , Finzel B.C. and Howard A.J.,
"High resolution crystal structure of cytochrome P-450 cam",
J. Mol. Biol., **195**, 687, 1987 ;

30 - Poulos T.L. and Howard A.J.,
"Crystal Structures of Metyrapone- and Phenylimidazole- Inhibited Complexes of Cytochrome P-450 cam ",
Biochem., **26**, 8165, 1987 ;

31 - Mansuy D.,
"Coordination chemistry of cytochrome P 450 and iron-porphyrins : relevance to pharmacology and toxicology",
Biochimie, **60**, 909, 1978 ;

32 - Nelson S.D. and Harvison P.J.,
"Mammalians Cytochromes P-450", chapitre 2, vol. 2, Guengerich Ed., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1986 ;

33 - Sherlock S.,
"The spectrum of hepatoxicity due to drugs",
Lancet, 23 août 1986, 440, 1986 ;

34 - Nebert D.W. et coll.,
"The P450 superfamily : Updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci",
DNA,1989, **8**, 1, 1989 ;

35 - Nebert D.W. and coll.,
"The P450 superfamily : Update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature",
DNA and Cell Biology, **10**, 1, 1991 ;

36 - Thuillier G., Laforest J., Cariou B., Bessin P., Bonnet J., Thuiller J.,
"Dérivés hétérocycliques d'acides phénoxyacétique, synthèse et étude préliminaire de leurs activités diurétiques et uricosuriques",
Eur. J. Med. Chem., **9**, 625, 1974 ;

37 - Sellman R.,
"Pharmacological and toxicological studies on tienilic acid",
Thèse de l'Université de Turku, section Pharmacologie, Turku (Finlande), 1981 ;

38 - Bray H.G., Carpanini F. M. B., and Waters B.D.,
"The metabolism of thiophen in the rabbit and the rat",
Xenobiotica, **1**, 157, 1971 ;

39 - Dansette P.M., Thang D.C., El Amri H.E. and Mansuy M.,
"*Evidence for thiophene-S-oxyde as a primary reactive metabolite of thiophene in vivo : formation of a dihydrothiophene sulfoxyde mercapturic acid*",
Biochem. Biophys. Res. Com., **186**, 1624, 1992 ;

40 - Dansette P.M., Amar C., Smith C., Pons C. and Mansuy D.,
"Hydroxylation and formation of electrophilic metabolites during metabolisme of tienilic acid and its isomer by rat liver microsomes",
Biochem. Pharmacol., **39**, 911, 1990 ;

41 - Mansuy D., Dansette P.M., Foures C., Jaouen M., Moinet G. and Bayer N.,
"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, 1984 ;

42 - Levron J.C., Le Fur J.M., Adnot P. and Dormard Y.,
"Pharmacokinetic study of 2,3-dichloro-4-(2-thienylketo^{14}Cphenoxyacetic acid",
Eur. Jour. Drug Metab. and Pharmacol., **3**, 107, 1977 ;

43 - Neau E.,
"Oxydation hépatique des dérivés du thiophène : enzymes impliquées et réactions biomimétiques",
Thèse de Doctorat d'Université Paris V en sciences pharmaceutiques, Paris, 1989 ;

44 - Valadon Ph.,
"cytochrome P-450 et activation métabolique du noyau thiophène : exemple de l'acide tiénilique et de ses dérivés",
Thèse de biologie moléculaire et cellulaire, Paris VI, 1992 ;

45 - Bonierebale E.,
"Activation métabolique de l'acide tiénilique chez l'homme. Recherche d'anticorps anti-médicament dans le serum de patients traités par le médicament",
D.E.A. de Toxicologie, Université Paris V, 1992 ;

46 - Pons C., Dansette P., Amar C., Jaouen M., Wolf C.R., Gregeois J., Homberg J.C. and Mansuy M.,
"Detection of human hepatitis anti-liver kidney microsomes (LKM2) autiantobodies on rat liver sections is predominantly due to reactivity with rat liver P-450 IIC11",
J. Pharm. Exp. Ther., **259**, 1328, 1991 ;

47 - Park B.K., Coleman J.W. and Kitteringham N.R.,
"Drug disposition and drug hypersensitivity",
Biochem. Pharm., **36**, 581, 1987 ;

48 - Carlsson J., Drevin H. and Axen R.,
"protein thiolation and reversible protein-protein conjugation",
Biochem. J., **173**, 723, 1978 ;

49 - Ellman,
Arch. Biochem. Biophys., **82**, 70 ; 1959 ;

50 - Steward M. W.,
"Overview : introduction to methods used to study the affinity and kinetics of antibody-antigen reactions",
Handbook of Experimental Immunology, vol. I, chap. 25, 4è ed. , Weir M. Ed., Oxford, 1986 ;

51 - Potter D.W., Pumford N. R., Hinson J.A., Benson R.W. and Roberts D.W.,
"Epitope characterisation of acetaminophen bound to protein and nonprotein sulfhydryl groups by an enzyme-linked immunosorbent assay",
J. Pharm. Exp. Ther., **248**, 182, 1989 ;

52 - Catty D. and Raykundalia C.,
"ANTIBODIES : a practical approach",
Catty D. Ed, 2 vol., IRL press, Oxford, 1988 ;

53 - Dresser D. W.,
"Immunisation of experimental animals",
Handbook of Experimental Immunology, vol. I, chap. 8, 4è ed. , Weir M. Ed., Oxford, 1986 ;

54 - Ternick Th., Avrameas S.,
"Techniques immunoenzymatiques",
Inserm Ed., Paris, 1987 ;

55 - Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.,
"Protein mesurement with the folin phenol reagent",
J.Biol. Chem., **193**, 265, 1961 ;

56 - Kremers P., Beaune P., Creteil P., Degraeve J., Columelli S., Leroux J.P. and Gielen J.E.,
"Cytochromes P-450 monooxygenases activities in human and rat liver microsomes",
Eur. J. Biochem, **118**, 599, 1981 ;

57 - Omura T., Sato R.,
"The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes",
J. Biol. Chem., **237**, 1375, 1962 ;

58 - Herbert M. et Pichat L.,
"Synthèse d'un diurétique marqué au carbone 14 : l'acide dichloro-2,3 [thénoyl-2 (^{14}C=O)] -4 phénoxyacétique (D.C.I. acide tiénilique)",

INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1	Les différentes phases de l'élimination d'un médicament.	1
Figure 2	Schématisation du cytochrome P-450 cam (P-450 CI) . .	11
Figure 3	Structure de l'hème.	13
Figure 4	Cycle catalytique du cytochrome P-450.	14
Figure 5	Structure de l'AT et de son isomère (TAI)..	17
Figure 6	Métabolisme de l'AT.	18
Figure 7	Métabolisme du TAI.	20
Figure 8	Hypothèse proposée pour expliquer l'apparition de néo antigènes à la surface de la cellule hépatique dans le cas de l'AT.	22
Figure 9	Hypothèse de reconnaissance croisée entre les anticorps anti-médicament humains et les anticorps anti-AT de lapin.. .	25
Figure 10	Principe du couplage de l'AT à la BSA par sa fonction carboxyle.	26
Figure 11	Motif chimique commun à l'ensemble des métabolites du TAI et analogie avec la structure de l'acide éthacrynique **11**.	27
Figure 12	Couplage de l'AT à la BSA au niveau de la position 5 du noyau thiophène.	28
Figure 13	Principe de la méthode de couplage de l'AT à la BSA au niveau de la position 5 du noyau thiophène.	29
Figure 14	Comparaison des spectres d'absorption U.V. de la BSA-AT, de la BSA et du dérivé 5-S-mercaptoéthanol-AT **13** . . .	30
Figure 15	Arcs de précipitation (technique d'Ouchterlony) entre la BSA-AT ou la BSA et les sérums des prélèvements 0, I et IV.	34
Figure 16	Courbes Elisa obtenues avec le prélèvement IV du lapin 2.	38
Figure 17	Estimation de l'affinité des Ac anti-AT pour le TAI par la	

	méthode de précipitation au sulfate d'ammonium	40
Figure 18	Structure des inhibiteurs testés.....	43
Figure 19	Courbes d'inhibition compétitive du test Elisa.....	45
Figure 20	Effets des différents déterminants chimiques du dérivé **13** sur la reconnaissance par les Ac anti-AT estimés par les ex périences d'inhibition du test Elisa.	50
Figure 21	Réponse Elisa du sérum KUT contre la BSA-AT et contre la BSA en fonction de la dilution du sérum.....	54
Figure 22	Réponse Elisa de l'ensemble des sérums testés.....	55
Figure 23	Réponse Elisa dirigée contre l'haptène AT substitué en 5 par un thioéther	56
Figure 24	Préparation de la fraction microsomale de foie de rat...	72
Figure 25	Protocole des tests Elisa	75
Figure 26	Calibrage de la sensibilisation des plaques Elisa	76
Tableau 1	Exemples d'enzymes reconnues comme antigènes impliqués dans des maladies autoimmunes spécifiques d'organe...	2
Tableau 2	Classification des maladies autoimmunes hépatiques...	4
Tableau 3	Principales réactions impliquées dans les biotransformations des xénobiotiques.....	10
Tableau 4	Analyse semi-quantitative des arcs de précipitation.....	35
Tableau 5	Titres Elisa observés sur l'ensemble des prélèvements..	37
Tableau 6	Fixations maximales des sérums et constantes d'affinité Kaobs. des Ac anti-AT pour le TAI	40
Tableau 7	Inhibition compétitive par des analogues de l'AT de la reconnaissance par les Ac anti-AT	46
Tableau 8	Origine des produits chimiques.....	65
Tableau 9	Composition des gels d'agar.....	69

RESUME

L'acide tiénilique (AT) est un diurétique responsable d'hépatites autoimmunes où les autoanticorps appelés anti-LKM2 sont dirigés contre les cytochromes P-450, justement responsables de la métabolisation de l'AT. Cette hépatite constitue un modèle d'étude des maladies autoimmunes spécifiques d'organes où les antigènes sont souvent des enzymes et pour lesquelles des facteurs étiologiques environnementaux ont été suggérés.

Afin d'étudier les néoantigènes formés par alkylation des protéines au cours de sa métabolisation, nous avons fixé l'AT à la sérumalbumine de bœuf. La protéine obtenue (BSA-AT) est immunogène chez le lapin et les anticorps obtenus (anticorps anti-AT) reconnaissent by Elisa les métabolites de l'AT fixés aux protéines. Ces anticorps sont en cours de développement.

Au moyen de la BSA-AT, nous avons recherché la présence d'anticorps anti-médicament dans les sérums de patients atteints d'hépatite. Les résultats préliminaires sont en faveur de la présence de ces anticorps dans les sérums de tous les patients prenant de l'AT.

SUMMARY

Tienilic acid (TA) is a diuretic drug responsible for autoimmune hepatitis in a few subjects. The sera of patients contain autoantibodies called anti-LKM2 wich recognize cytochromes P450's. These P450's also catalyze the metabolic activation of TA.

We describe the haptenization of bovine serumalbumin with TA (BSA-AT). This protein injected to rabbits produce the formation of antibodies (anti-TA) which recognize TA metabolites bound to microsomal proteins as shown by Elisa. These antibodies should be an efficient tool to investigate covalent binding of TA.

With BSA-AT and by Elisa, we have looked for the possible occurence of antibodies raised against TA in the sera of patients suffering from hepatitis. Our preliminary results show that all the sera of patients treated with TA recognize BSA-AT and that the control sera do not.

MOTS CLES acide tiénilique, hépatite autoimmune, cytochrome P450, anticorps anti-médicament, anticorps anti-LKM2, autoimmunité.

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques
URA 400 CNRS
45, rue des Saints Pères 75270 Paris Cedex 06 France
tel. 42 86 21 91 fax 33 (1) 42 86 83 87