



HAL
open science

Mécanisme des hépatites immunoallergiques induites par l'acied tiénilique: Activation métabolique de ce médicament et fixation covalente sur les cytochromes P4502C chez l'homme et le rat

Eric Bonierbale

► To cite this version:

Eric Bonierbale. Mécanisme des hépatites immunoallergiques induites par l'acied tiénilique: Activation métabolique de ce médicament et fixation covalente sur les cytochromes P4502C chez l'homme et le rat. Toxicologie. Université René Descartes - Paris V, 1996. Français. NNT: . tel-00654392

HAL Id: tel-00654392

<https://theses.hal.science/tel-00654392>

Submitted on 21 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.

**Thèse de Doctorat de l'Université Paris V
Spécialité TOXICOLOGIE**

présentée par

Eric BONIERBALE

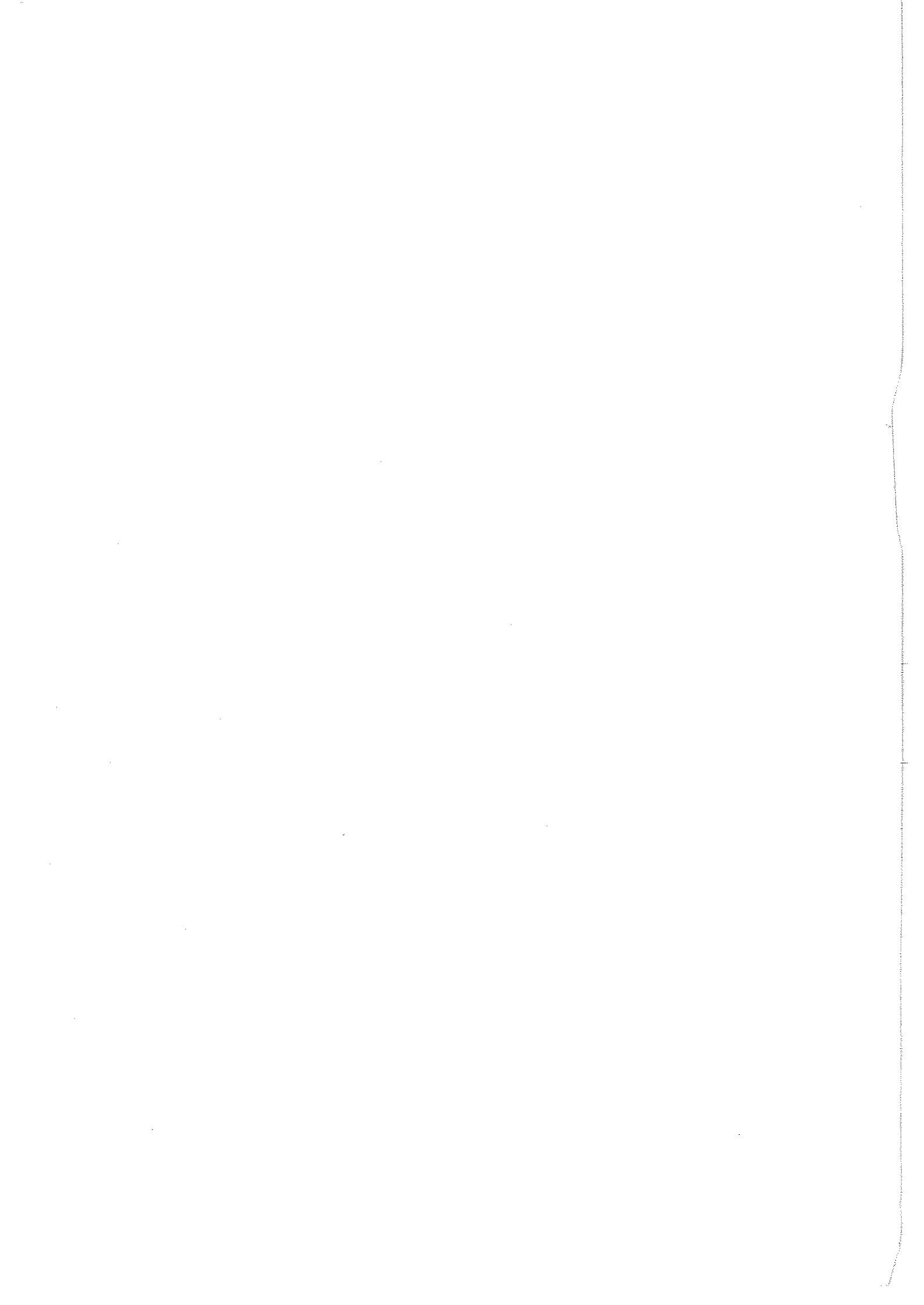
pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris V

**Mécanisme des hépatites immunoallergiques
induites par l'acide tiénilique : Activation
métabolique de ce médicament et fixation covalente
sur les cytochromes P4502C chez l'homme et le rat**

Soutenue le 19 décembre 1996

devant le jury constitué de :

Monsieur Philippe DRUET	Rapporteur
Monsieur Dominique PESSAYRE	Rapporteur
Monsieur Philippe BEAUNE	Examineur
Monsieur François BALLET	Examineur
Monsieur Patrick DANSETTE	Examineur



Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques de Monsieur Daniel MANSUY.

Je tiens à remercier Monsieur Daniel MANSUY de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche. Je souhaiterais également lui témoigner ma profonde reconnaissance pour m'avoir judicieusement conseillé aux moments importants. Sa rigueur et son professionnalisme ont été des modèles pour moi.

J'exprime ma gratitude à Monsieur Philippe BEAUNE d'abord pour m'avoir accueilli dans le DEA National de Toxicologie en septembre 1991 et ensuite pour me faire l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur Philippe DRUET qui a accepté sans hésiter d'être rapporteur scientifique de ma thèse.

Je tiens à remercier Monsieur PESSAYRE pour avoir accepté d'être rapporteur scientifique de ma thèse malgré la charge de travail supplémentaire que cette tâche nécessite.

Je tiens à remercier Monsieur François BALLEST d'avoir pris sur son temps de travail pour accepter de participer à ce jury.

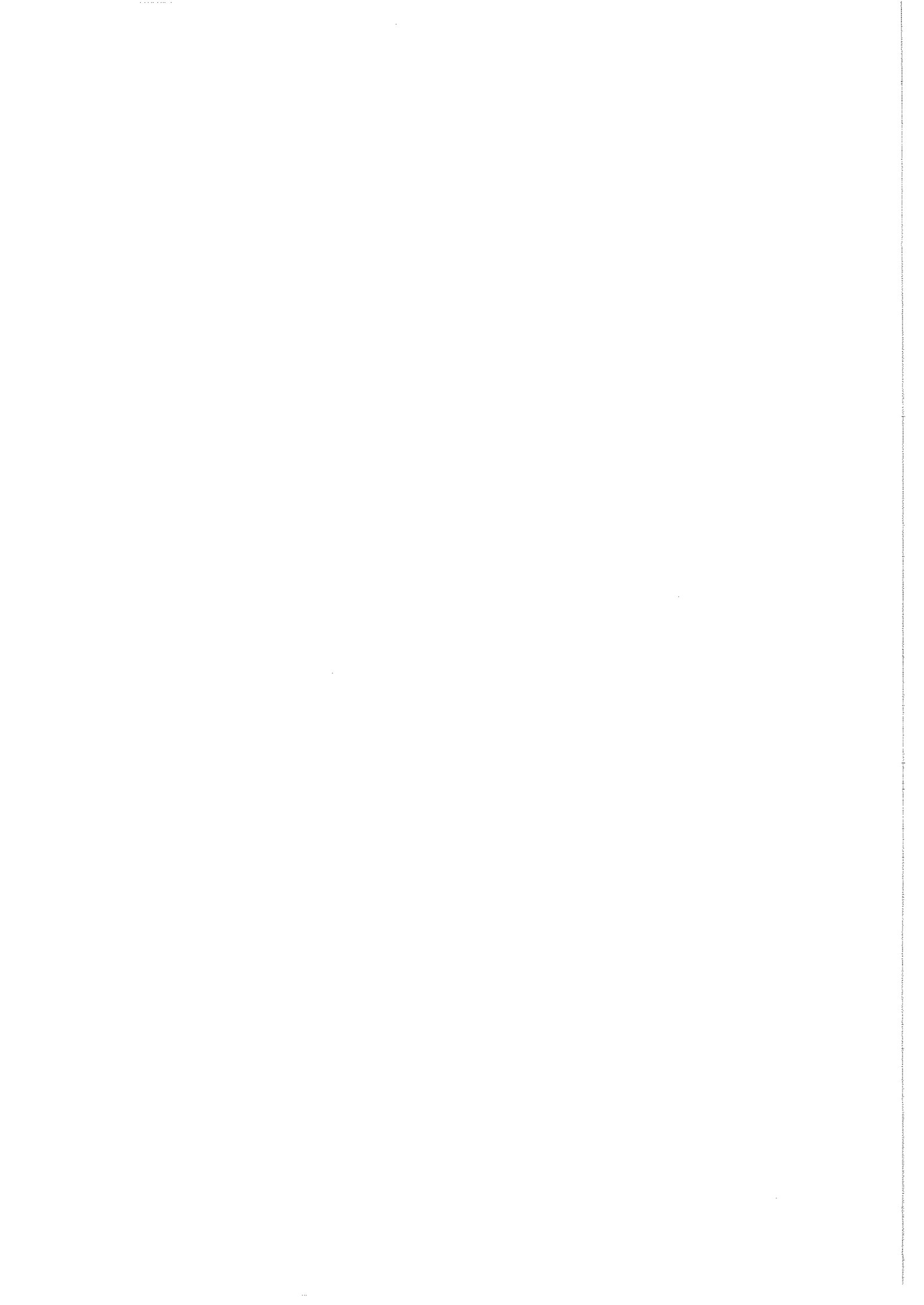
J'ai eu l'opportunité et la chance de travailler aux côtés de Monsieur Patrick DANSETTE qui m'a fait partager sa soif de connaissances, ses compétences et son expérience. Je lui suis particulièrement reconnaissant pour les conseils avisés qu'il m'a prodigués. J'ai particulièrement apprécié la gentillesse et la confiance qu'il m'a témoignées durant ces quatre années passées au Laboratoire.

Je souhaiterais remercier Monsieur Philippe VALADON pour les nombreux conseils qu'il m'a prodigués durant mon DEA et Monsieur Bernard DESFOSSÉS pour sa contribution à ce travail.

Que Monsieur Lucien COPPET, Monsieur Séraphin DELAMANCHE, ainsi que Mesdames Lydia DEBORDÉS, Danièle BERNHARDT et Danièle DEKONINCK soient remerciés pour leur accueil au sein du Centre d'Études du Bouchet, pour leur gentillesse, leur confiance et leurs conseils. Une mention spéciale pour Madame Lydia DEBORDÉS avec qui j'ai eu le plaisir et la chance formidable de travailler pendant deux ans. Son professionnalisme et son caractère humain exceptionnel ont constitué un enseignement particulièrement riche et dense.

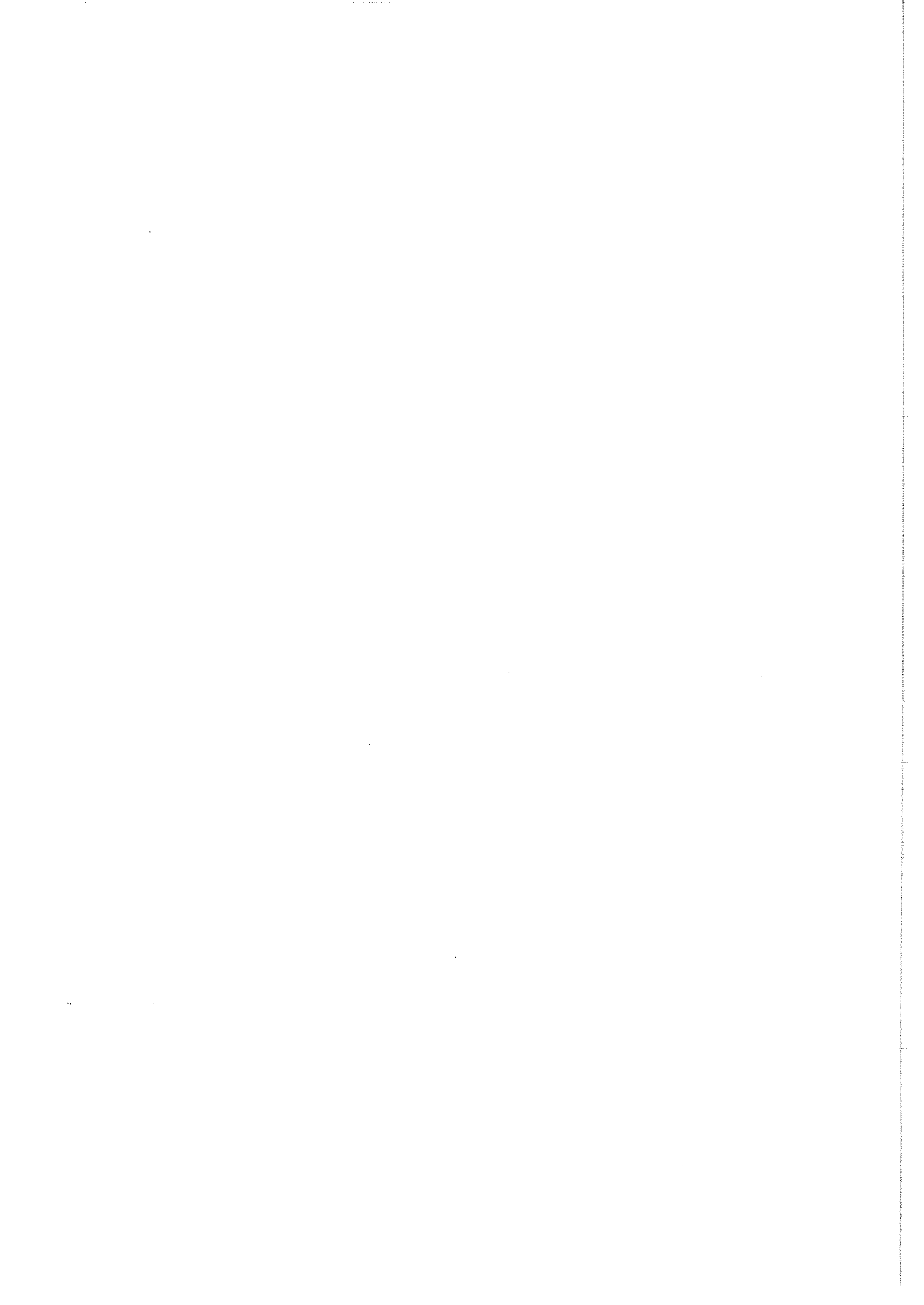
Je tiens à remercier Messieurs Marcel DELAFORGE et Jean-Luc BOUCHER, ainsi que Mademoiselle Pilar LOPEZ-GARCIA et Mesdames Maryse JAOUEN, Mylène BISSON et Colette DESCHAMPS pour leur disponibilité, leur aide et leurs nombreux conseils. Là encore une mention spéciale pour Madame Maryse JAOUEN auprès de qui j'ai beaucoup appris sur le plan technique et qui m'a témoigné une gentillesse sans faille au fil des années.

Que les membres du Laboratoire qui, par leur présence amicale, leurs conseils et leur disponibilité, m'ont aidé durant mon passage au sein de l'URAOO croient en ma reconnaissance.



Jé voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à certaines personnes (dont beaucoup sont "des anciens" du Laboratoire). Leur présence a énormément compté pour moi:

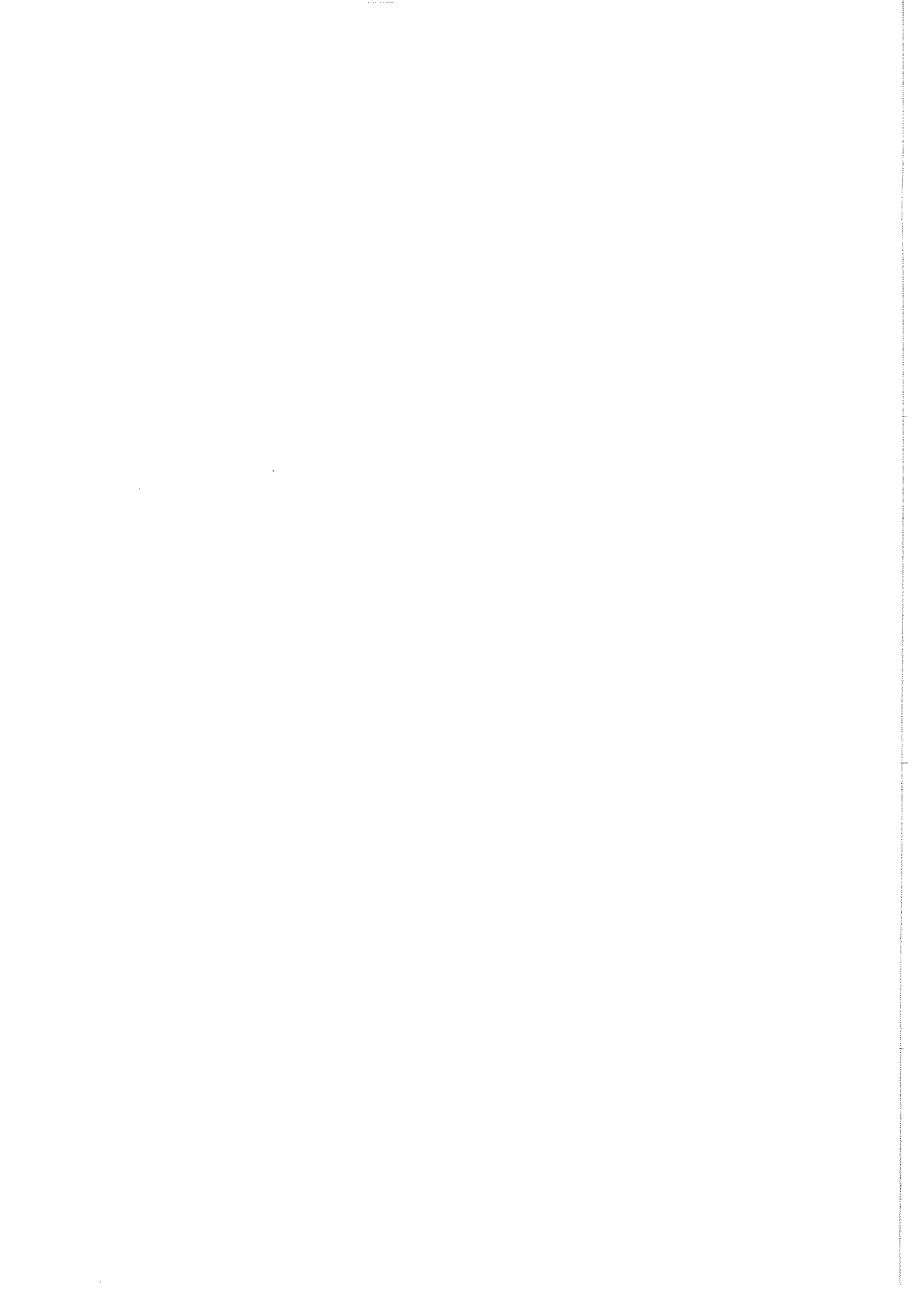
Lydie BAUDOIN, Magalie BAUDRIMONT, Claude BENSOUSSAN,
Bénédicté BEYLOT, Hamid EL AMRI, Axelle FORTUN, Marie-Aude KOPF
Damien LEMAIRE, Annah MANCY, Xénia MILONAKI
Axelle RENODON, Olivier THUET.



A mes parents et mon frère Thomas

A Phillip et Rosemarie Moore

A mes amis...



Introduction	1
I Le métabolisme des xénobiotiques	3
I-1 Présentation.....	3
I-2 Les monooxygénases à P450.....	4
I-2-1 Rôles et structure.....	4
I-2-2 Cycle catalytique.....	8
I-2-3 Classification.....	9
I-2-4 Localisation.....	11
I-2-5 variabilité d'expression.....	12
Polymorphisme génétique.....	13
Induction.....	15
Inhibition.....	18
I-3 Formation de métabolites réactifs.....	18
I-3-1 Activation métabolique de médicaments et P450.....	18
Voie oxydative.....	18
Voie réductrice.....	20
I-3-2 Mécanismes de protection.....	21
Inactivation métabolique du cytochrome P450.....	21
Détoxication des espèces réactives de l'oxygène.....	21
Transformation en métabolites stables.....	22
I-3-3 Activation métabolique et enzymes de phase II.....	22
I-3-4 Réaction des métabolites in situ.....	23
II Les hépatites aiguës médicamenteuses	24
II-1 Aspects cliniques, biochimiques et histologiques.....	24
II-1-1 Les hépatites cytolytiques.....	24
II-1-2 Les hépatites cholestatiques.....	24
II-1-3 Les hépatites mixtes.....	25
II-2 Les hépatites médicamenteuses toxiques.....	25
II-2-1 Caractéristiques.....	25
II-2-2 Origine des lésions.....	25
II-2-3 Conséquences d'une rupture de l'homéostasie calcique.....	26
II-2-4 Origine multifactorielle des hépatites médicamenteuses toxiques ..	27
II-3 Les hépatites médicamenteuses à médiation immunitaire.....	28
II-3-1 Caractéristiques.....	28
II-3-2 Implication du système immunitaire.....	28
Immunité naturelle et immunité spécifique.....	28
Reconnaissance de l'Ag par les lymphocytes B.....	29
Reconnaissance de l'Ag par les lymphocytes T.....	30
Activation complète, partielle ou nulle des lymphocytes T.....	31
Les deux signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T naïfs.....	33
Coopérations cellulaires.....	33
II-3-3 Mécanismes postulés des hépatites à médiation immunitaire.....	34
II-3-4 Facteurs influant leur développement.....	37
Modifications qualitatives des peptides présentés.....	37
Modifications quantitatives des peptides présentés.....	38
Autres facteurs.....	38
II-3-5 Exemples.....	39
Hépatite induite par l'halothane.....	39
Hépatite induite par l'iproniazide.....	42
Hépatite induite par les anti-convulsivants.....	42
Hépatite induite par le diclofénac.....	44
Hépatite induite par la dihydralazine.....	45
Hépatite induite par l'acide tiénilique.....	46
II-3-6 Adduits médicament/macromolécule biologique. Techniques d'étude.....	48
III Les motivations du travail	50

Résultats	51
I Métabolisme de l'isomère de l'acide tiénilique in vitro chez l'homme.....	52
I-1 Motivations du travail.....	52
I-2 Recherche d'une S-oxydation microsomale de l'IAT in vitro chez l'homme..	53
I-2-1 Métabolisme de l'IAT en absence de mercaptoéthanol.....	53
I-2-2 Métabolisme de l'IAT en présence de mercaptoéthanol.....	56
I-3 Détermination de la structure des quatre produits de piégeage par le mercaptoéthanol.....	58
I-4 Détermination de la structure du métabolite I.....	60
I-5 Influence des anti-LKM2 sur la formation des métabolites de l'IAT.....	63
I-6 Influence de différentes conditions d'incubation sur la formation des métabolites de l'IAT.....	64
I-7 Conclusion.....	66
II Étude de la fixation covalente de l'AT et de l'IAT sur les protéines microsomales hépatiques chez l'homme.....	68
II-1 Motivations du travail.....	68
II-2 Couplage de la β -lactoglobuline (BLG) au niveau du noyau thiophène de l'acide tiénilique (BLG-5S-AT).....	70
II-2-1 Principe du couplage.....	70
II-2-2 Résultat.....	70
Synthèse de la BLG-5S-AT.....	70
Caractérisation de la BLG-AT.....	71
II-3 Obtention d'anticorps spécifiques de la fixation covalente de l'AT sur des protéines.....	72
II-3-1 Immunisation des animaux, obtention des sera et détermination de l'efficacité de l'immunisation.....	72
II-3-2 Principe de l'ELISA.....	72
II-3-2 Concentration optimale de BLG-5S-AT pour sensibiliser les plaques ELISA.....	73
II-3-3 Titration des anti-AT contre la BLG-AT.....	74
II-3-4 Titration des anti-AT contre des adduits de l'IAT.....	75
II-3-5 Expériences d'inhibition compétitive.....	76
II-3-6 Conclusion.....	79
II-4 Détection de la fixation covalente de l'AT et de l'IAT sur les protéines microsomales après activation métabolique.....	81
II-4-1 Spécificité de la fixation covalente de l'AT sur des microsomes de levure exprimant le CYP2C9 humain (pAAH5/MP-4).....	82
II-4-2 Spécificité de la fixation covalente de l'IAT sur des microsomes de levure pAAH5/MP-4.....	84
II-4-3 Spécificité de la fixation covalente de l'AT sur des microsomes hépatiques humains.....	85
II-4-4 Spécificité de la fixation covalente de l'IAT sur des microsomes hépatiques humains.....	87
II-4-5 Spécificité de la fixation covalente de l'AT et de l'IAT sur les microsomes hépatiques humains confirmée par une analyse radiochimique.....	88
II-4-6 Influence du traitement des adduits par différentes concentrations de mercaptoéthanol sur la stabilité de la fixation covalente de l'AT chez l'homme.....	89
II-5 Conclusion.....	91
III Étude de la fixation covalente de l'AT chez le rat.....	93
III-1 Motivations du travail.....	93
III-2 Fixation covalente de l'AT in vitro.....	93
III-2-1 Sur microsomes de rats contrôles.....	94
III-2-2 Sur microsomes de rats induits au clofibrate.....	96
III-2-3 Sur microsomes de rats induits au phénobarbital.....	97
III-2-4 Conclusion.....	98

Plan

III-3 Cinétique de la fixation covalente de l'AT in vivo.....	101
III-3-1 Sur microsomes de rats contrôles et de rats traités au phénobarbital.....	102
Rats contrôles.....	102
Rats traités au phénobarbital.....	103
III-3-2 Sur cytosols de rats contrôles et de rats traités au phénobarbital .	104
III-3-3 Influence de l'alkylation du CYP2C11 in vivo sur son activité chez le rat contrôle.....	105
III-3-4 Sur coupes de foie de rats contrôles.....	106
III-3-5 Conclusion.....	112
IV Recherche d'anticorps dirigés contre la fixation covalente de l'AT sur les protéines chez l'homme.....	114
IV-1 Motivations du travail.....	114
IV-2 Reconnaissance de la SAB-5S-AT par les sera humains.....	115
IV-2-1 Détermination de la quantité d'antigène idéale pour sensibiliser les puits des microplaques ELISA.....	115
IV-2-2 Réponse de différents patients traités avec l'AT vis à vis de la SAB-5S-AT et de la SAB non modifiée.....	115
IV-2-3 Comparaison de la réponse de différents sera vis à vis de la SAB-5S-AT, de la SAB thiolée et de la SAB non modifiée.....	117
IV-3 Reconnaissance de la BLG-5S-AT par les sera humains.....	118
IV-3-1 Détermination de la quantité d'antigène idéale pour sensibiliser les puits des microplaques ELISA.....	118
IV-3-2 Comparaison de la réponse anti-AT de différents groupes de sera.....	120
IV-3-3 Tentatives d'inhibition de la reconnaissance de la BLG-5S-AT par les sera de patients traités avec l'AT.....	121
IV-4 Conclusion.....	124
Conclusion générale.....	126
Perspectives.....	127
Matériels et méthodes.....	129
I Produits et réactifs.....	130
II Traitement des animaux et préparation des fractions microsomales et cytosoliques hépatiques.....	130
Animaux.....	130
Induction au phénobarbital.....	131
Induction au clofibrate.....	131
Préparation des microsomes et cytosols de foies de rats.....	131
Dosage des protéines.....	132
Dosage du contenu en cytochromes P450 et b5.....	132
III Métabolisme de l'IAT in vitro chez l'homme.....	132
Incubations analytiques.....	132
Préparation des échantillons CLHP.....	132
Incubations préparatives et prépurification sur SepPack.....	133
Réalisation des éluogrammes CLHP et des radiochromatogrammes.....	133
Mesure de la fixation covalente aux protéines microsomales.....	133
Études en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	134
Autres techniques spectroscopiques.....	134
Préparation d'un échantillon authentique I issu de la réduction de la fonction cétone de l'IAT.....	134
Préparation du métabolite I.....	134
IV Étude de la fixation covalente de l'AT et de l'IAT.....	135
Conservation des souches.....	135
Transformation de la levure.....	135
Composition du milieu de culture et conditions de culture.....	135
Préparation des microsomes de levure.....	136

Plan

Protocole des incubations d'AT ou d'IAT en présence des microsomes.....	137
Effet du mercaptoéthanol sur la fixation covalente de l'AT.....	137
Synthèse du mercaptoéthanol-5S-AT (MEA-5S-AT).....	137
Synthèse de la SAB-5S-AT par la méthode au SPDP.....	138
Thiolation de la SAB.....	138
Couplage avec l'acide 5-chloro tiénilique.....	138
Techniques immunochimiques.....	139
Immunsation.....	139
Réalisation des prélèvements et préparation des sera.....	139
Obtention de la fraction des immunoglobulines.....	139
Protocole des tests ELISA.....	140
Préparation des métabolites du l'IAT fixés aux protéines microsomaes	141
Électrophorèse et transfert.....	141
Immunorévélations.....	142
Révélations in situ sur coupes de foie de rat.....	142
Références bibliographiques.....	144
Publications et communications en congrès.....	166

Abréviations

5 α DHT	5 α dihydrotestostérone
ABTS	acide 2, 2'-azino-di (3'-éthyl-benzothiazole sulfonique)
AC	anticorps
ADCC	cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag	antigène
AhR	aryl hydrocarbon receptor (récepteur d'hydrocarbures aromatiques)
ALAT	alanine aminotransférase
ARNT	Ah receptor nuclear translator
AT	acide tiénilique
ATP	adénosine triphosphate
CLHP	chromatographie liquide haute pression
CD4/CD 8	cluster of differenciation 4/8 (marqueurs de surface de cellules hématopoïétiques)
Ci	Curie
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPAg	cellule présentatrice de l'antigène
CYP	cytochrome P450
DCCA	acide 2,3-dichlorophénoxyacétique
DDTC	diéthylthiocarbamate
DETAPAC	acide diéthylènetriamine pentaacétique
DMSO D6	diméthyl-d ₆ sulfoxyde
DO	densité optique
DTT	dithiotréitol
E2	sous-unités dihydrolipoamide acétyl transférase
EDTA	éthylènediamine sodique
EH	époxyde hydrolase
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fc	fragment constant
G6P	glucose-6-phosphate
G6PDH	glucose-6-phosphate deshydrogénase
GSH	glutathion
HAP	hydrocarbure aromatique polycyclique
HLA	human leucocyte antigen (le complexe majeur d'histocompatibilité humain)
hsp	protéine de choc thermique
IAT	isomère de l'acide tiénilique
IFN γ	interféron gamma
IL	interleukine
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LKM	liver/kidney microsomes (microsomes de foie et de rein)
LM	liver microsomes
MAO	monoamine oxydase
MEA-5S-AT	AT couplé au β -mercaptoéthanol en position 5 du noyau thiophène
NADH	nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit
NADP(H)	nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate oxydé (réduit)
NAT	N-acétyl transférase
NK	natural killer
P450	cytochrome P450
PAGE	gel d'électrophorèse à base de polyacrylamide
PBS(T)	tampon phosphate de sodium (contenant du Tween 20)
RMN	résonance magnétique nucléaire
RSA	rabbit serum albumine
SAB	serum albumine de boeuf
SAB-5S-AT	acide tiénilique couplé à la sérum albumine bovine en position 5 du noyau thiophène
SAB-N-AT	acide tiénilique couplé à la sérum albumine bovine par son extrémité carboxylique
SKF 525A	diéthylaminoéthyl 2,2 diphényl valérate
SPDP	N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate
BLG	β -lactoglobuline
TAO	triacétyloléandomycine
Tc	lymphocyte T cytotoxique
TCA	acide trichloro acétique
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
TCR	récepteur de cellule T
Th	lymphocyte T auxiliaire
UDPGT	uridine diphosphate-glucuronosyl transférase
UV	ultra violet
XRE	xenobiotic responsive elements

Index des médicaments cités dans l'introduction

Médicament	Propriété/usage thérapeutique	Numéro de page
acétaminophène.....	analgésique, antipyrétique.....	10,19,27,49
acide éthacrynique.....	diurétique.....	27
acide tiénilique.....	diurétique uricosurique.....	2,10,13,46,47,50
acide valproïque.....	anticonvulsivant.....	27
amiodarone.....	anti-arythmique.....	10
bufuralol.....	β-bloquant vasodilatateur.....	10
carbamazépine.....	anticonvulsivant.....	10,19,38,42,43
chloramphénicol.....	antibiotique bactériostatique.....	21
chloroforme.....	anesthésique.....	18,20,26
chlorpromazine.....	neuroleptique.....	25
chlorzoxazone.....	myorelaxant.....	10
clofibrate.....	hypolipémiant.....	17,22
codéine.....	antitussif.....	10
coumarine.....	lymphokinétique, antioœdémateux.....	10
débrisoquine.....	anti-hypertenseur.....	10,13,14
desflurane.....	anesthésique.....	41,42
dexaméthasone.....	anti-inflammatoire.....	13,17
dextrométhorphan.....	antitussif.....	10
diazépam.....	anxiolytique, sédatif.....	10
diclofénac.....	anti-inflammatoire non stéroïdien.....	10,26,44,45,49
diflunisal.....	anti-inflammatoire non stéroïdien.....	22
dihydralazine.....	anti-hypertenseur.....	21,45,46
disulfiram.....	traitement de l'alcoolisme.....	27
enflurane.....	anesthésique.....	10,11,41,42
érythromycine.....	antibiotique macrolide.....	10,16,25,38
éthynylestradiol.....	contraception orale.....	21
fer.....	anémie.....	26
fluroxène.....	anesthésique.....	21
fluvoxamine.....	psychotrope, antidépresseur.....	13
furafylline.....	anti-asthmatique.....	13
halothane.....	anesthésique.....	10,11,20,38-41,49
imipramine.....	antidépresseur, anticholinergique.....	10
iproniazide.....	antidépresseur.....	42
isoflurane.....	anesthésique.....	10,11,41
isoniazide.....	antibiotique, bactéricide.....	13
kétoconazole.....	antifongique.....	13
lidocaïne.....	anesthésique.....	10
méphénytoïne.....	anticonvulsivant.....	10,15
miconazole.....	antifongique.....	18
nifédipine.....	inhibiteur calcique.....	10
nirvanol.....	anticonvulsivant.....	10
oméprazole.....	anti-ulcéreux.....	10,13,15
phénacétine.....	antalgique, antipyrétique.....	10
phénobarbital.....	anticonvulsivant, sédatif.....	16,17,42
phénytoïne.....	anticonvulsivant.....	10,16,19,42
piroxicam.....	anti-inflammatoire non stéroïdien.....	10
proguanil.....	antipaludéen.....	15
quinidine.....	anti-arythmique.....	10,13
rifampicine.....	antibiotique.....	13,16
sécobarbital.....	anticonvulsivant.....	21
sels d'or.....	antirhumatismal.....	34,38
sévoflurane.....	anesthésique.....	22
tacrine.....	anticholinestérasique.....	10,20,26
tamoxifène.....	anti-oestrogène.....	10
taxol.....	anticancéreux.....	10
tolbutamide.....	hypoglycémiant.....	10,15
trichloroéthylène.....	anesthésique.....	22
triacétyloléandomycine.....	antibiotique macrolide.....	10,13,17
valpromide.....	anticonvulsivant.....	27
warfarine.....	anticoagulant, antivitamine K.....	10,14,15

INTRODUCTION

Introduction

Le nombre d'admissions hospitalières provoquées par les effets secondaires d'un traitement thérapeutique augmente de façon sensible et constitue par conséquent un problème majeur de santé publique. Ce constat découle principalement du nombre croissant de médicaments introduits sur le marché chaque année et de l'allongement de l'espérance de vie qui s'accompagne d'une médicalisation importante. L'hépatite médicamenteuse, la pathologie iatrogène la plus fréquente, pose également un problème d'ordre économique. En effet, l'hépatotoxicité des médicaments constitue la première cause de leur retrait du marché pharmaceutique. La non détection de ce potentiel hépatotoxique avant commercialisation s'explique principalement par la faible fréquence d'apparition des hépatites médicamenteuses (1/10 000 à 1/100 000). La rareté de telles pathologies met en évidence le caractère idiosyncratique de ce type hépatites médicamenteuses. Celles-ci se divisent en deux types : les hépatites médicamenteuses qualifiées de directes et à l'inverse les hépatites médicamenteuses immunoallergiques. Les mécanismes sous-jacents des hépatites médicamenteuses idiosyncratiques sont généralement méconnus et leur compréhension constitue donc à la fois un impératif de santé publique et économique. Mon travail s'est inscrit dans cette optique et a consisté à appréhender les premières étapes impliquées dans l'apparition des hépatites idiosyncratiques et en particulier celle induite par l'acide tiénilique. En effet, ce diurétique retiré du marché pharmaceutique français en 1992 a été responsable de nombreuses hépatites immunoallergiques.

L'hépatotoxicité idiosyncratique ne se manifeste généralement qu'après activation du médicament, une étape principalement dépendante des monooxygénases à cytochromes P450. Par conséquent, la première partie de l'introduction présentera d'abord ce groupe d'enzymes fortement impliqué dans le métabolisme des médicaments. Seront ensuite décrits les mécanismes de génération de métabolites réactifs liés à l'activation des médicaments. La seconde partie décrira rapidement les caractéristiques des deux types d'hépatites médicamenteuses idiosyncratiques et précisera le rôle de la réponse immunitaire spécifique dans celles d'origine immunoallergique. Différents exemples d'hépatites à médiation immunitaire seront ensuite discutés. Viendront alors les résultats qui apporteront des éléments de réponse concernant les premières étapes qui conduisent à l'apparition de l'hépatite immunoallergique induite par l'acide tiénilique (AT) : métabolisme de l'isomère de l'acide tiénilique *in vitro* chez l'homme pour modéliser l'activation de l'acide tiénilique lui-même ; mise en évidence des caractéristiques de la fixation covalente de l'AT et de son isomère qui découle de l'activation de ces deux molécules. Cette caractérisation sera présentée *in vitro* chez l'homme puis sera étudiée pour l'AT chez le rat afin de déterminer si cet animal constitue un bon modèle d'étude. Suivra alors une cinétique de la fixation covalente de l'AT *in vivo* chez le rat. Cette étude permettra de formuler des hypothèses sur la localisation des adduits chez l'homme. Enfin, l'influence de la fixation covalente sur la réponse immunitaire sera abordée. En particulier, nous chercherons la présence éventuelle d'anticorps dirigés contre des adduits de l'acide tiénilique chez des patients traités avec ce médicament.

I Le métabolisme des xénobiotiques

I-1 Introduction

De très nombreuses molécules exogènes pénètrent quotidiennement dans notre organisme. Celui-ci doit donc les éliminer afin d'éviter leur accumulation potentiellement nuisible. Ces molécules, appelées xénobiotiques, présentent généralement un caractère hydrophobe et possèdent des structures et des origines très diverses. Ainsi, les xénobiotiques comprennent à la fois les substances biologiques étrangères à notre organisme et les molécules issues de l'industrie chimique. Alors que nous bénéficions des effets positifs de certains xénobiotiques (médicaments), d'autres représentent une menace pour l'homme (toxines) et nécessitent une neutralisation préalable à leur excrétion. Par conséquent, l'organisme a du très tôt déployer un système censé répondre à un double impératif: **détoxiquer et éliminer**. Un métabolisme basé sur la présence d'enzymes multifonctionnelles s'est donc progressivement mis en place. Ce métabolisme se décompose en deux phases distinctes placées sous le contrôle d'enzymes différentes.

La phase I regroupe l'ensemble des réactions qui permettent de **fonctionnaliser** le xénobiotique. Cette étape consiste essentiellement à conférer un caractère hydrophile à une molécule pour faciliter son élimination ultérieure. Les réactions d'oxydations représentent les transformations les plus fréquentes réalisées par les enzymes de phase I. Cependant, dans certains cas, il s'agit au contraire de réductions ou encore d'hydrolyses. Un système multi-enzymatique de monooxygénases à fonction mixte comprenant le cytochrome P450 catalyse principalement les réactions de la phase I.

La phase II rassemble les réactions biosynthétiques qui permettent une **conjugaison** de molécules polaires (dont certains métabolites issus de la phase I) à des molécules endogènes hydrophiles. Les dérivés conjugués issus de ces transformations présentent alors une clairance fortement accrue comparée à celle du xénobiotique initial. Les enzymes de phase II se distinguent par le type de molécule qu'elles vont associer aux métabolites des xénobiotiques. Ainsi, les glucuronosyltransférases, les glutathion *S*-transférases, les sulfotransférases et les *N*-acétyl transférases catalysent respectivement des conjugaisons à l'acide glucuronique, au glutathion, au sulfate inorganique et à des groupements acétyls.

Dans la plupart des cas les réactions de phase I et II remplissent leur rôle de détoxification et d'élimination. Il arrive cependant que les biotransformations de certains xénobiotiques et plus particulièrement de certains médicaments conduisent à une **activation** en métabolites réactifs (figure I-1). Ces derniers possèdent une réactivité vis à vis des macromolécules biologiques et

peuvent induire des phénomènes de **toxicité** de type, fréquence et ampleur variables. La formation de métabolites réactifs au cours de la biotransformation de médicaments est principalement dépendante des enzymes de phase I et particulièrement des monooxygénases à P450 (Park *et al.*, 1995 ; Paine, 1995).

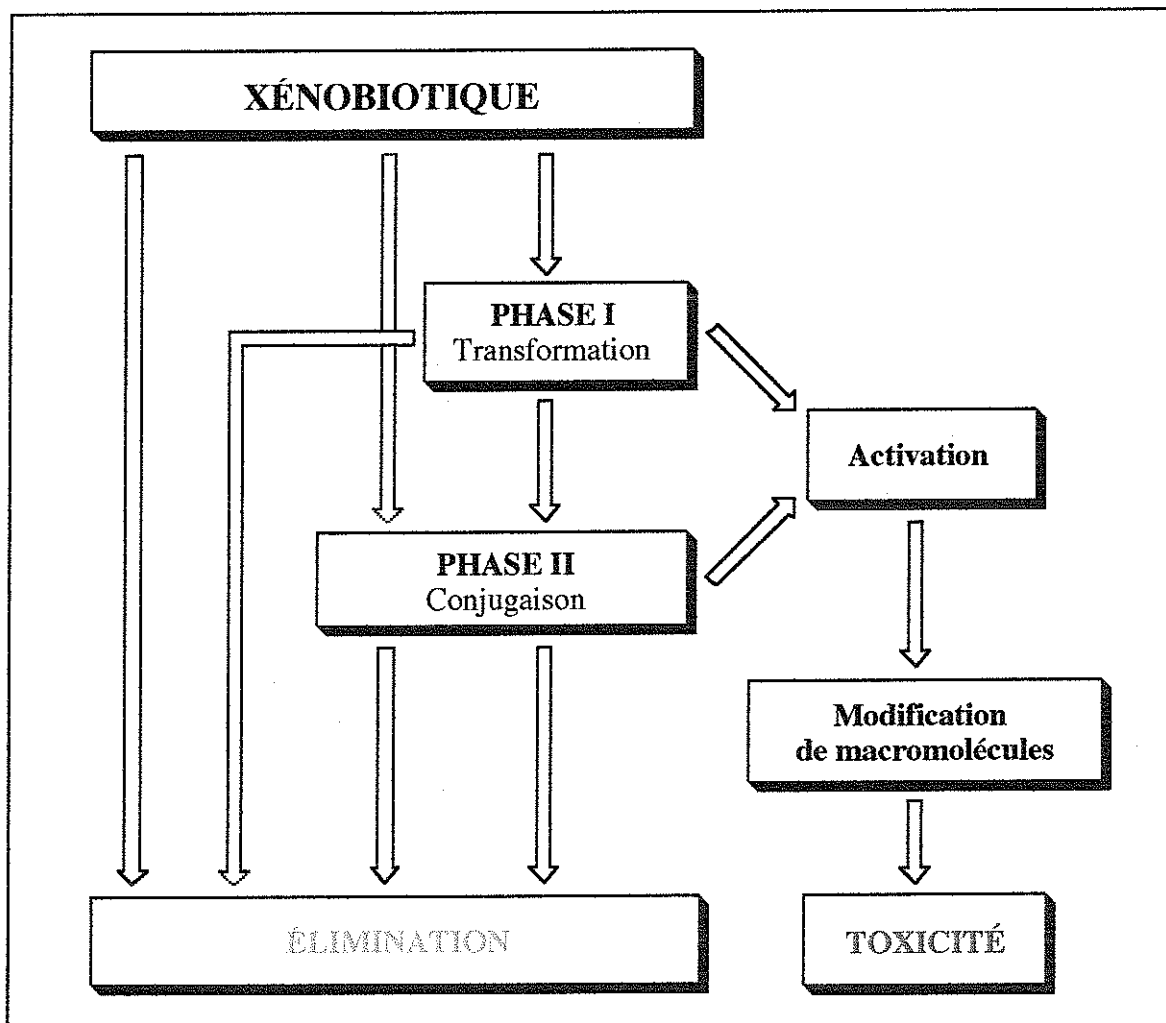


Figure I-1. Devenir d'un médicament dans l'organisme.

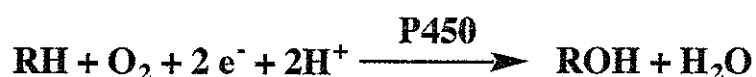
I-2 Les monooxygénases à P450

I-2-1 Rôles et structure

Les monooxygénases à P450 sont les principales enzymes impliquées dans le **métabolisme des médicaments** ainsi que dans les biotransformations de xénobiotiques en général (Porter *et al.*, 1991). Elles interviennent également dans le “ **turn-over** ” de **substances endogènes** généralement hydrophobes et possédant des activités physiologiques diverses. Ainsi, la synthèse d'hormones stéroïdes (Keeney *et al.*, 1993), d'acides gras (Laethem *et al.*, 1996), des acides biliaires (Danielsson *et al.*, 1975) ou encore des médiateurs de l'inflammation.

(prostaglandines et leucotriènes) (Haurand *et al.*, 1985 ; Roman *et al.*, 1993) implique les enzymes à P450. La diversité des substances endogènes métabolisées par les P450 confère à ces protéines un rôle clé dans le maintien et la régulation de nombreuses fonctions physiologiques (Nebert, 1994). En effet, les enzymes à P450 participent à l'homéostasie cellulaire ainsi qu'à la régulation des fonctions neuroendocrines. Leur implication s'étend également aux mécanismes de différenciation, de croissance et d'apoptose (Nelson *et al.*, 1996).

Les monooxygénases à P450 catalysent l'insertion d'un atome d'oxygène moléculaire dans le substrat et la réduction de l'autre atome d'oxygène en eau selon l'équation suivante (Mansuy *et al.*, 1993 ; de Montellano, 1995):



Les monooxygénases à P450 sont des **complexes enzymatiques membranaires** composés de deux protéines (figure I-2) : la NADPH P450 réductase et le cytochrome P450. La NADPH P450 réductase est une flavoprotéine qui assure le transfert d'électrons nécessaires aux réactions d'oxydations catalysées par le cytochrome P450 *via* le cofacteur NADPH. Un autre complexe, constitué du cytochrome b5 et de sa réductase associée participe également à l'apport électronique du cytochrome P450.

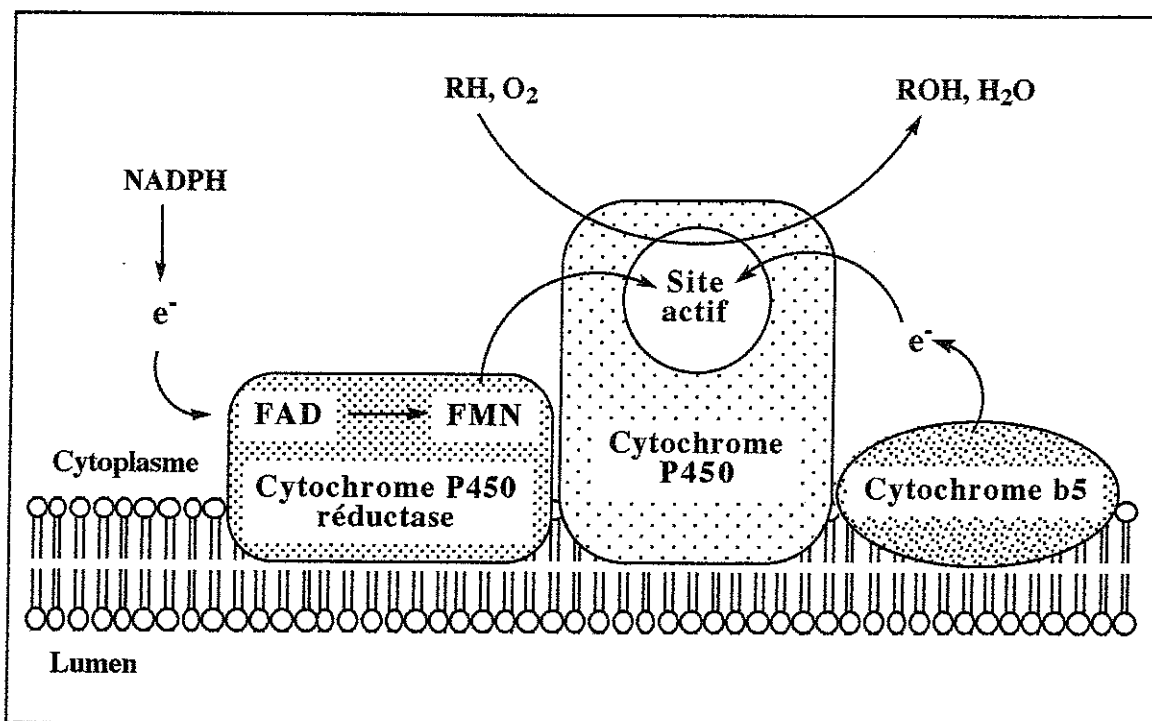


Figure I-2. Constituants du système monooxygénase à P450. FAD: Flavine adénine dinucléotide; FMN: Flavine mononucléotide.

Introduction

Les phospholipides membranaires associés aux monooxygénases à P450 remplissent une double fonction. Ils assurent à la fois l'ancrage des différentes composantes du complexe enzymatique dans la membrane du réticulum endoplasmique et facilitent également les interactions qui s'établissent entre celles-ci (Vergeres *et al.*, 1989 ; Black, 1992). Les monooxygénases à P450 présentent une **orientation cytosolique** (Edwards *et al.*, 1991 ; Szczesna-Skorupa *et al.*, 1995).

Les cytochromes P450 appartiennent à la classe des **hémoprotéines**. Ils possèdent une chaîne polypeptidique unique (apoprotéine), d'une masse moléculaire comprise entre 45 et 60 kD et un groupement prosthétique (hème). L'hème, lié de façon covalente à l'apoprotéine par une liaison thiolate, est situé dans une cavité globalement hydrophobe de la protéine qui constitue le site actif de l'enzyme (figure I-3).

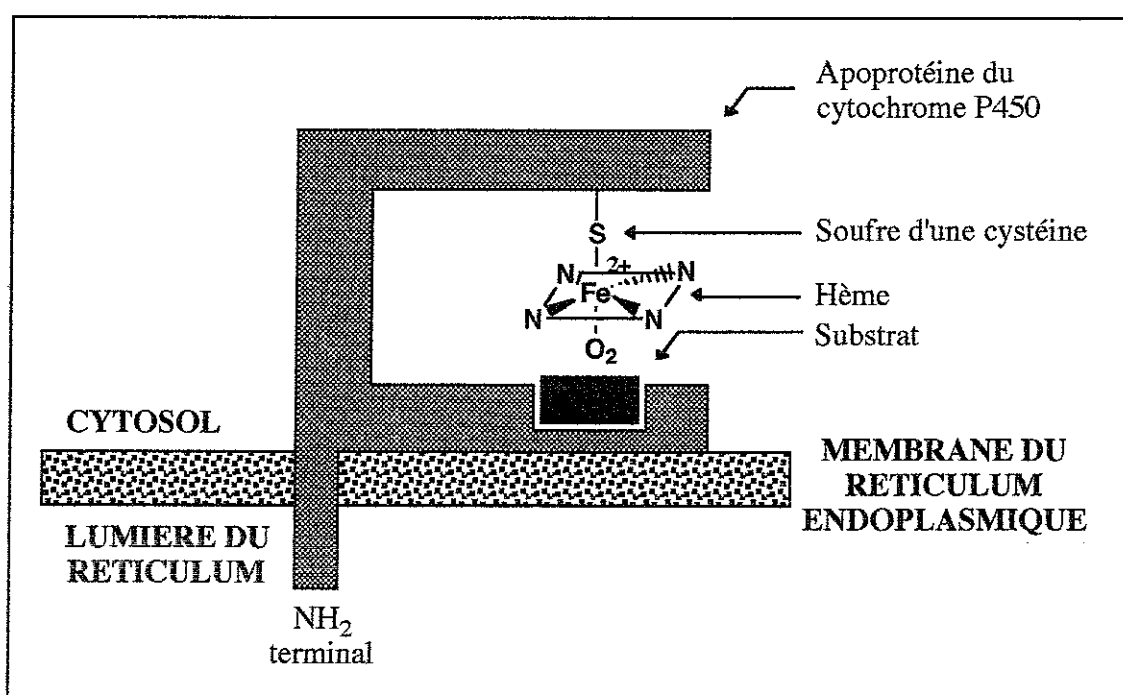


Figure I-3. Structure schématique du cytochrome P450.

Jusqu'à présent, il n'existe aucune structure cristalline de cytochrome P450 eucaryote. La difficulté d'obtention de cette information provient essentiellement de la très grande hydrophobicité de ces P450 membranaires. Par contre, la diffraction aux rayons X a permis de déterminer les structures tridimensionnelles de 4 P450 procaryotiques solubles. Il s'agit des P450 cam (Poulos *et al.*, 1985; 1986), BM-3 (Ravichandran *et al.*, 1993), terp (Hasemann *et al.*, 1994) et eryF (Cuppvickery *et al.*, 1994; 1995). Les séquences primaires des P450 solubles bactériens et celles de leurs homologues eucaryotiques présentent des différences importantes liées en partie à la localisation membranaire de ces derniers. Cependant, des alignements de séquence entre les P450 bactériens et animaux font apparaître des régions fortement conservées.

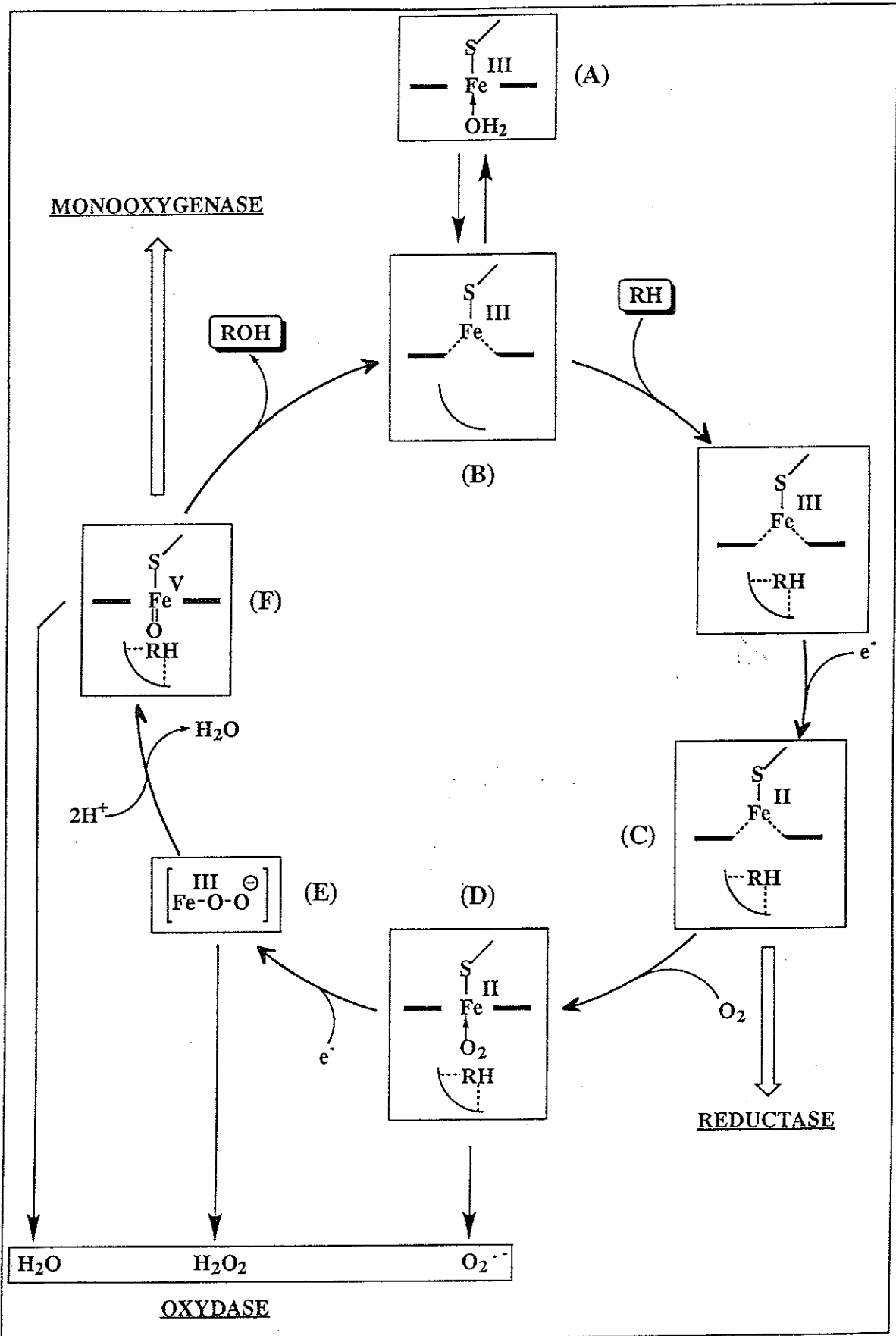


Figure I-5. Cycle catalytique des monoxygénases à cytochrome P450.

I-2-2 Cycle catalytique

Une **protoporphyrine IX de Fer** constitue le groupement prosthétique du P450. En l'absence de substrat, le fer est à l'état oxydé Fe^{3+} et se présente sous deux états en équilibre: spin faible (A) et spin fort (B) (figure I-4). A l'état spin faible, le fer est hexacoordiné avec une molécule d'eau ou un acide aminé oxygéné localisés en *trans* du ligand cystéine proximal. A l'état spin fort, le fer est pentacoordiné et sort légèrement du plan formé par le noyau pyrrolique. La liaison fer-thiolate constitue la particularité du cytochrome P450. En effet, cette liaison n'existe pas dans les autres protéines à fer hémique (hémoglobine, peroxydase...) et elle possède une influence importante sur les différentes réactions catalysées par les cytochromes P450.

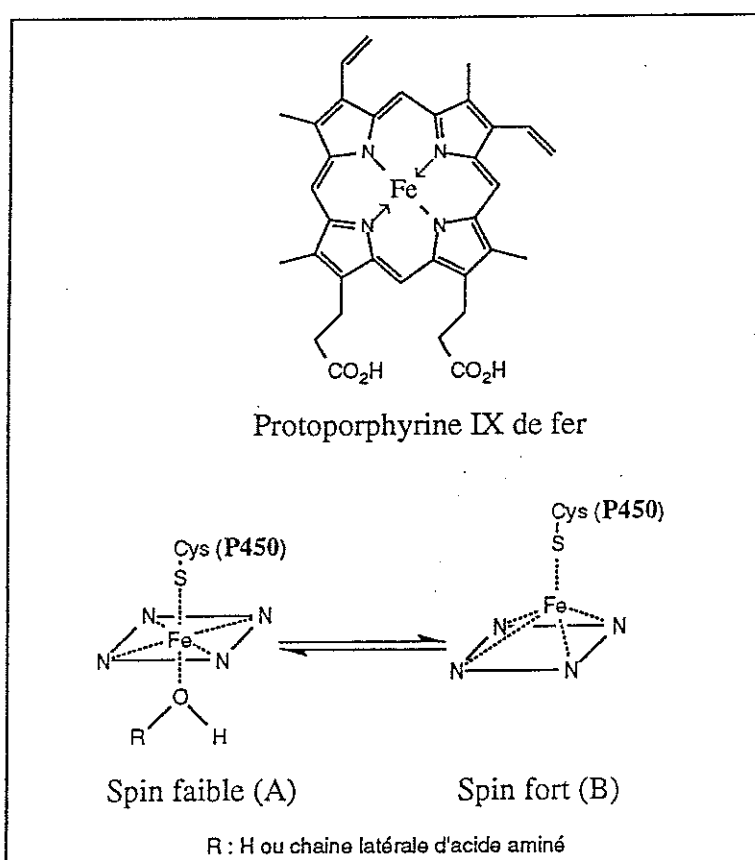


Figure I-4. Structure de l'hème et états de spin du fer.

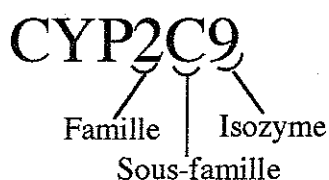
La fixation du substrat sur un site voisin de l'hème déplace l'équilibre de coordination du fer vers l'état spin fort (figure I-5). Ce dernier est plus facilement réduit en un complexe pentacoordiné ferreux haut spin (C) par l'addition d'un électron provenant du NADPH. La fixation d'une molécule d'oxygène sur le complexe (C) conduit à l'état hexacoordiné (D). Un second électron permet la réduction du complexe (D) en une intermédiaire très instable, probablement un peroxyde ferrique (E). L'électron provient soit du NADPH *via* la NADPH cytochrome P450 réductase ou du NADH *via* le cytochrome b5. Le clivage de la liaison O-O de

l'intermédiaire instable (E) fournit le complexe fer-oxo (F) qui est très probablement responsable de l'**activité monooxygénase** du cytochrome P450 (Mansuy *et al.*, 1993 ; de Montellano, 1995). Cette activité des P450 est la plus fréquente (Guengerich, 1991a) ; elle permet des hydroxylations de composés aliphatiques ou aromatiques, des époxydations d'alcènes ainsi que des *N*-oxydations d'amines et des *S*-oxydations de thioéthers.

Les P450 possèdent également deux activités atypiques : une fonction réductase et une fonction oxydase. L'**activité réductasique** des P450 s'exprime généralement en conditions anaérobies, elle implique le complexe (C) et aboutit à des deshalogénations ainsi qu'à des réductions d'époxydes d'arènes, de nitrés aromatiques et d'oxydes d'amines (Mansuy, 1994). L'**activité oxydase** tire son origine de la production d'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, d'eau oxygénée ou d'eau à partir des complexes (D), (E) ou (F) respectivement.

I-2-3 Classification

Les cytochromes P450 constituent une **superfamille de gènes** retrouvés dans les règnes eucaryotes et procaryotes. Actuellement, le Comité de Nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (NC-IUBMB) recense plus de 480 gènes codant pour des P450 (Nelson *et al.*, 1996). Le Comité classe ces protéines en 74 familles dont 14 existent chez tous les mammifères. Ces 14 familles se décomposent en 26 sous-familles; 20 d'entre-elles se retrouvent chez l'homme. Les membres d'une même sous-famille forment généralement un cluster de gènes adjacents sur un même chromosome (Nebert *et al.*, 1991). Par contre, les différentes sous-familles sont souvent plus ou moins dispersées le long du génome. A de rares exceptions près, chaque gène code pour un seul P450. La classification officielle des P450 repose sur des comparaisons de leurs séquences primaires protéiques. Ainsi, les membres d'une même famille présentent une homologie de séquence supérieure de 40%, cette homologie devient supérieure à 55% entre P450 d'une sous-famille donnée. La nomenclature internationale recommande l'usage du préfixe CYP suivie du nombre de la famille et de la lettre indiquant la sous-famille pour identifier les P450. Les différents membres au sein d'une sous-famille (isozymes) se différencient alors par un chiffre. Les gènes correspondants reprennent la même nomenclature mais se notent en italique (ex. *CYP2C9*).



Parmi les 20 familles de P450 recensées chez l'homme, les 3 premières participent au métabolisme des xénobiotiques (Nelson *et al.*, 1996) et plus particulièrement les sous-familles 1A, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E et 3A (Guengerich, 1995). Le tableau I-1 présente les principales

isoformes responsables de la prise en charge des médicaments. Il convient de souligner qu'un même composé peut être métabolisé par différentes isoformes et que les P450 présentent donc une certaine spécificité croisée à l'égard de certains substrats.

Tableau I-1. Exemples de réactions catalysées par les principaux P450 hépatiques humains des sous-familles 1A, 2A, 2C, 2E et 3A.

P450	Réactions*	Référence
1A2	Acétaminophène (phénol) oxydation <u>Phénacétine O-dééthylation</u> Tacrine 1-, 4- et 7-hydroxylation Tamoxifène N-déméthylation <i>(R)</i> -Warfarine 6-hydroxylation	(Patten <i>et al.</i> , 1993) (Distlerath <i>et al.</i> , 1985) (Madden <i>et al.</i> , 1991) (Simon <i>et al.</i> , 1993) (Zhang <i>et al.</i> , 1995)
2A6	<u>Coumarine 7-hydroxylation</u>	(Yamano <i>et al.</i> , 1990)
2C8	Carbamazépine 10,11-époxydation <u>Taxol 6α-hydroxylation</u>	(Kerr <i>et al.</i> , 1994) (Rahman <i>et al.</i> , 1994)
2C9	Acide Tiénilique 5-hydroxylation Diclofénac 4',3'- et 5-hydroxylation <u>Phénytoïne 4'-hydroxylation</u> Piroxicam 5-hydroxylation <u>Tolbutamide (méthyle) hydroxylation</u> <i>(S)</i> -Warfarine 7-hydroxylation	(Lopez-Garcia <i>et al.</i> , 1993) (Leemann <i>et al.</i> , 1992) (Veronese <i>et al.</i> , 1991) (Leemann <i>et al.</i> , 1993) (Brian <i>et al.</i> , 1989) (Rettie <i>et al.</i> , 1992)
2C19	<u>Diazépam N-déméthylation</u> <i>(S)</i> -Méphénytoïne 4'-hydroxylation Nirvanol 4-hydroxylation Oméprazole (méthyle) hydroxylation	(Yasumori <i>et al.</i> , 1993) (Brian <i>et al.</i> , 1989) (Shimada <i>et al.</i> , 1986) (Andersson <i>et al.</i> , 1990)
2D6	<u>Bufuralol 1-hydroxylation</u> Codéine O-déméthylation <u>Débrisoquine 4-hydroxylation</u> <u>Dextrométhorphane O-déméthylation</u> Imipramine 2-hydroxylation	(Dayer <i>et al.</i> , 1985) (Dayer <i>et al.</i> , 1988) (Broly <i>et al.</i> , 1991) (Mortimer <i>et al.</i> , 1989) (Lemoine <i>et al.</i> , 1993)
2E1	Acétaminophène (phénol) oxydation <u>Chlorzoxazone 6-hydroxylation</u> Enflurane hydroxylation Halothane hydroxylation	(Nelson, 1995) (Peter <i>et al.</i> , 1990) (Garton <i>et al.</i> , 1995) (Gruenke <i>et al.</i> , 1988)
3A4	Amiodarone N-dééthylation <u>Erythromycine N-déméthylation</u> Lidocaïne N-dééthylation Nifédipine (dihydropyridine) oxydation Quinidine 3-, et N-hydroxylation Triacétyloléandomycine N-déméthylation	(Fabre <i>et al.</i> , 1993) (Brian <i>et al.</i> , 1990) (Bargetzi <i>et al.</i> , 1989) (Guengerich <i>et al.</i> , 1986a) (Guengerich <i>et al.</i> , 1986b) (Renaud <i>et al.</i> , 1990)

*En souligné : certaines activités caractéristiques des différentes isoformes considérées.

Parmi ces P450, le **CYP3A4** joue un rôle prépondérant dans le métabolisme des médicaments (Guengerich *et al.*, 1994). En effet, ce P450 prend en charge plus de 60 substrats différents (Guengerich, 1995). Il représente l'isoforme hépatique majoritaire, sa concentration pouvant atteindre 60% du contenu total en P450 dans cet organe (Guengerich, 1990). Le **CYP2D6** possède lui aussi une gamme de substrats assez étendue, il catalyse l'oxydation d'au moins 40 médicaments appartenant à différentes classes thérapeutiques (Guengerich, 1995). Les membres de la **sous-famille 2C** (CYP2C8, 2C9, 2C18 et 2C19) partagent une homologie de séquence supérieure à 80% qui rend difficile l'évaluation de leurs rôles respectifs. Néanmoins, l'isoforme prépondérante dans le métabolisme des médicaments est le CYP2C9. Les P450 de cette sous-famille activent de nombreux anti-inflammatoires non stéroïdiens et des anti-épileptiques (Guengerich, 1995). Le **CYP1A2** ne possède pas un rôle majeur dans l'oxydation des médicaments. Cependant il catalyse la *N*-hydroxylation d'amines hétérocycliques carcinogènes retrouvées dans les grillades ou la fumée de cigarette (McManus *et al.*, 1990). Le **CYP2E1** est le seul représentant de sa sous-famille chez l'homme. Cette isoforme contribue de façon limitée au métabolisme des médicaments. Cependant, il métabolise plusieurs anesthésiques halogénés volatiles (halothane, isoflurane, enflurane, sevoflurane,...) (Kharasch *et al.*, 1993; 1996). Le CYP2E1 intervient dans l'oxydation de l'alcool (Asai *et al.*, 1996) ainsi que dans l'activation de nombreux carcinogènes (généralement de faible masse) tels que des nitrosamines (Yamazaki *et al.*, 1992). Le **CYP2A6** présente une certaine spécificité croisée avec le CYP2E1 vis à vis de l'oxydation des nitrosamines (Yamazaki *et al.*, 1992) mais n'est que faiblement impliqué dans le métabolisme des médicaments.

I-2-4 Localisation

Les P450 se retrouvent dans tous les organes qui constituent des voies d'entrée ou de passage pour les médicaments (peau, fosses nasales, poumons, œsophage, intestin, estomac, foie, reins,...). Néanmoins, **le foie** est l'organe principalement impliqué dans le métabolisme des médicaments. Son contenu en P450 s'élève à quelques 5000 nmoles/kilo (Guengerich, 1990). L'exposition constante du foie aux xénobiotiques d'origine digestive et systémique explique probablement une telle concentration en P450. En effet, la veine porte draine les composés en provenance de l'intestin et représente environ 80% de l'irrigation hépatique sanguine totale. Ce mécanisme constitue l'effet de premier passage et soumet le foie à des concentrations importantes de médicaments (Willson, 1991).

Pratiquement tous les types cellulaires (sauf les muscles lisses et les globules rouges) possèdent des P450 enchâssés dans la **membrane du réticulum endoplasmique** granuleux ou lisse de la cellule. Néanmoins, les mitochondries contiennent également des P450 (Guzov *et al.*, 1994) qui semblent principalement impliqués dans le métabolisme de substances endogènes. De même, certains P450 s'intègrent à la membrane plasmique d'hépatocytes (Loeper *et al.*, 1993).

I-2-5 variabilité d'expression

La quantité totale en P450 hépatiques ne varie qu'en de faibles proportions (généralement 3 fois) d'un individu à l'autre (Distlerath *et al.*, 1987). Les concentrations pour un P450 déterminé peuvent toutefois subir des différences interindividuelles de l'ordre de 10 à 1000 (tableau I-2). Ces différences entraînent des fluctuations importantes dans le métabolisme des médicaments ainsi que dans l'efficacité des traitements. Ainsi, un individu peut présenter des concentrations plasmatiques élevées pour un médicament (ou un de ses métabolites) si l'activité impliquée dans l'élimination de ce composé est absente, anormalement faible ou inhibée. Cette accumulation peut entraîner une exagération de l'effet thérapeutique ou même une toxicité du médicament. Par contre, si l'activité nécessaire à l'expression de l'effet pharmacologique d'un médicament est encore une fois absente, anormalement faible ou inhibée, ce médicament sera inefficace. De même, si un patient possède au contraire une quantité importante de l'isoforme responsable de l'élimination d'un médicament, un traitement aux doses usuelles avec ce médicament sera également inefficace. Plusieurs facteurs déterminent les variations individuelles affectant les concentrations et les activités des différents P450 hépatiques :

- **le polymorphisme génétique** constitue la principale cause de modulation du taux de synthèse ou de l'efficacité de l'induction d'un P450. Ce polymorphisme peut également conduire à la synthèse d'une protéine présentant une activité catalytique modifiée. La présence d'un polymorphisme pour un P450 divise la population en métaboliseurs lents d'une part et métaboliseurs rapides d'autre part pour les activités qu'il catalyse. Le polymorphisme génétique se définit par l'existence de modifications autosomales récessives génétiquement héritées qui affectent plus de 2% de la population (Guengerich, 1995). Les mutations de moindre incidence constituent, pour leur part, des variations génétiques.

- **l'induction enzymatique** explique également les fluctuations qui affectent l'expression de certains P450. Certains médicaments, des composés chimiques, des habitudes alimentaires (amines hétérocycliques trouvées dans les grillades) ou des comportements sociaux (consommation d'alcool ou de cigarette, etc...) constituent des sources d'induction de l'expression de certains P450 (Park *et al.*, 1996).

- **l'inhibition enzymatique** représente le troisième mécanisme modulateur des activités enzymatiques placées sous la dépendance des P450. L'inhibition irréversible d'un P450 entraîne ainsi une baisse de ses activités caractéristiques. Certains médicaments ou des composés rentrant dans l'alimentation (Bailey *et al.*, 1991) constituent des inhibiteurs spécifiques de certaines formes de P450 (Halpert *et al.*, 1994; 1995). Ce phénomène peut être à l'origine d'interactions médicamenteuses sévères si le P450 impliqué dans l'élimination d'un des médicaments est inhibé par un autre administré simultanément (Murray *et al.*, 1990 ; Spina *et al.*, 1996).

L'âge ou l'alimentation d'un individu semblent moduler dans une moindre mesure les concentrations de certains P450 (George *et al.*, 1995). Chez l'animal, le statut hormonal

Introduction

(Pampori *et al.*, 1994), la présence de lymphokines (Chen *et al.*, 1995), le sexe ou l'alimentation (Murray *et al.*, 1996 ; Nugonbaudon *et al.*, 1996) représentent des facteurs de fluctuations pour certains P450.

Tableau I-2. Caractéristiques des principaux P450 hépatiques humains impliqués dans le métabolisme des médicaments (adapté de (de Montellano, 1995)).

CYP	Contribution ¹ (%)	Variabilité interindividuelle ²	Polymorphisme [métaboliseurs lents en %] ³	Inducteurs	Inhibiteurs
1A2	12	40	(+)	TCDD grillades	Fluvoxamine Furafylline
2A6	4	3	+ [2]		DDTC
2C9	20 (total 2C)	25 (total 2C)	+ [4]	barbiturates rifampicine	Sulfaphénazole Ac. Tiénilique
2C19	20 (total 2C)	~100	+ [3]	barbiturates rifampicine	Oméprazole
2D6	4	>1000	+ [7]		Quinidine
2E1	6	20	(+)	éthanol isoniazide	Méthylpyrazole DDTC
3A4	28	20	-	barbiturates rifampicine Dexaméthasone	TAO Kétoconazole

¹ de l'isoforme considéré à l'ensemble du contenu hépatique en P450.

² rapport entre les concentrations en P450 minimales et maximales

³ incidence dans la population caucasienne.

(+) polymorphisme génétique suspecté mais non confirmé.

Polymorphisme génétique

Le polymorphisme génétique du CYP2D6 a été caractérisé à partir de l'activité débrisoquine hydroxylase (Idle *et al.*, 1978). A ce jour, 29 allèles différents sont recensés pour le gène *CYP2D6*. Le tableau I-3 présente les principaux ainsi que les mutations responsables de la modification de l'activité enzymatique (Krynetski *et al.*, 1996 ; Daly *et al.*, 1996a). Environ 75% des métaboliseurs lents possèdent l'allèle *CYP2D6*4A* ou *CYP2D6*4B* qui comporte de nombreuses mutations. Ces mutations induisent un épissage anormal de l'ARNm. De 10 à 15% des métaboliseurs lents présentent une délétion de l'ensemble du gène (*CYP2D6*5*) (Gaedigk *et al.*, 1991). L'allèle *CYP2D6*3*, présent chez 5% des métaboliseurs lents, provient de la délétion d'une paire de base dans l'exon 5 qui induit une modification du cadre de lecture (Kagimoto *et al.*, 1990). De telles mutations perturbent le métabolisme des médicaments chez

les personnes atteintes. A l'opposé, un phénotype "super rapide" se retrouve chez certaines personnes qui présentent un métabolisme anormalement élevé pour les substrats du CYP2D6 (Johansson *et al.*, 1993 ; Aklillu *et al.*, 1996). Ce phénomène provient de l'amplification ou de la duplication de l'allèle fonctionnel du *CYP2D6*. Cette modification constitue un trait dominant hérité. De plus, l'expression du CYP2D6 diffère de façon considérable d'une race à l'autre. Ainsi, le phénotype métaboliseur lent pour l'hydroxylation de la débrisoquine touche moins de 1% des populations asiatique et africaine (Nakamura *et al.*, 1985 ; Relling *et al.*, 1991).

Tableau I-3. Principaux allèles du gène CYP2D6, origines de la mutation et conséquence sur l'activité de l'enzyme.

Allèle	Mutation	Activité enzymatique*	Référence
<i>CYP2D6*1A</i>	-	N	(Gonzalez <i>et al.</i> , 1988)
<i>CYP2D6*3</i>	A2637 délétion	0	(Kagimoto <i>et al.</i> , 1990)
<i>CYP2D6*4A</i>	C188 → T; C1062 → A A1072 → G; C1085 → G G1749 → C; G1934 → A G4268 → C	0	(Kagimoto <i>et al.</i> , 1990)
<i>CYP2D6*4B</i>	C188 → T; C1062 → A A1072 → G; C1085 → G G1934 → A; G4268 → C	0	(Kagimoto <i>et al.</i> , 1990)
<i>CYP2D6*5</i>	délétion complète du <i>CYP2D6</i>	0	(Gaedigk <i>et al.</i> , 1991)
<i>CYP2D6*6A</i>	T1795 délétion	0	(Saxena <i>et al.</i> , 1994)
<i>CYP2D6*6B</i>	T1795 délétion; G2064 → A	0	(Evert <i>et al.</i> , 1994b)
<i>CYP2D6*7</i>	A3023 → C	0	(Evert <i>et al.</i> , 1994a)

* N, normale; 0, nulle.

Le polymorphisme génétique du gène *CYP2C9* se traduit par l'existence de plusieurs protéines distinctes. En effet, il existe plusieurs variants alléliques dont deux principaux : le plus fréquent (8% de la population caucasienne américaine, (Sullivanklose *et al.*, 1996)) diffère de l'allèle sauvage *CYP2C9*1* par une transition C → T localisée au sein de l'exon 3 (Kimura *et al.*, 1987). Cette modification entraîne une substitution Arg¹⁴⁴ → Cys¹⁴⁴ et fournit l'allèle variant désigné *CYP2C9*2* (Daly *et al.*, 1996b). Le second variant allélique (6% de la population caucasienne américaine, (Sullivanklose *et al.*, 1996)) provient d'une transversion A → C localisée dans l'exon 7 (Romkes *et al.*, 1991). Cette modification entraîne la substitution Ile³⁵⁹ → Leu³⁵⁹ et fournit l'allèle désigné *CYP2C9*3*. *In vitro*, le variant *CYP2C9*2* possède une V_{max} pour la 7-hydroxylation de la (S)-warfarine inférieure d'un

Introduction

facteur 9 à celle du CYP2C9 sauvage (CYP2C9 *1) (Rettie *et al.*, 1994). Cette différence entraîne une diminution de la clairance de la (*S*)-warfarine chez les patients hétérozygotes (CYP2C9 *1/CYP2C9 *2) comparé aux homozygotes sauvages (CYP2C9 *1/CYP2C9 *1) (Furuya *et al.*, 1995). Ainsi le maintien de l'activité anticoagulante de la (*S*)-warfarine est obtenu avec des doses plus faibles chez les patients hétérozygotes. Plus récemment, Goldstein et son groupe ont montré que le variant CYP2C9*3 présente un rapport V_{max}/K_m pour l'hydroxylation de la tolbutamide inférieur au CYP2C9*1 sauvage et aux autres variants alléliques (Sullivanklose *et al.*, 1996). Le variant CYP2C9*3 semble donc responsable au moins en partie du phénotype métaboliseur lent pour l'hydroxylation de la tolbutamide.

Le polymorphisme génétique du gène CYP2C19 entraîne des perturbations dans la capacité des métaboliseurs lents à métaboliser la (*S*)-méphénytoïne ainsi que l'oméprazole et ses analogues, le proguanil et certains barbiturates (de Morais *et al.*, 1994b). La modification la plus fréquente rencontrée chez les sujets métaboliseurs lents est une mutation ponctuelle m1 (G→A) affectant le site d'épissage de l'exon 5 du CYP2C19 (Kagimoto *et al.*, 1990). L'ARNm résultant ne possède pas les 40 premières bases de l'exon 5 ce qui modifie le cadre de lecture et induit un codon stop. La mutation m2 qui correspond à la transition de la base 636 localisée dans l'exon 4 introduit un codon stop prématuré et fournit également une protéine tronquée et inactive (de Morais *et al.*, 1994a). L'expression du CYP2C19, comme celle du CYP2D6, diffère de façon considérable d'une race à l'autre. Ainsi, le phénotype métaboliseur lent pour l'hydroxylation de la (*S*)-méphénytoïne touche environ 20% de la population asiatique (Nakamura *et al.*, 1985).

Induction

L'exposition de l'organisme à certains xénobiotiques entraîne des modulations de l'expression de nombreux P450 hépatiques. Ces modulations interviennent à différents niveaux : transcription du gène, maturation ou stabilisation de l'ARNm, traduction ou stabilisation de la protéine active (Park *et al.*, 1996). L'induction d'une isoforme de P450 peut faire intervenir plusieurs mécanismes distincts. Ainsi, l'**alcool** stabilise le CYP2E1 à faibles concentrations et stimule la transcription du gène de l'enzyme à fortes concentrations (Ronis *et al.*, 1993 ; Badger *et al.*, 1993).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) induisent la transcription des gènes des CYP1A1, 1A2 (Whitlock, 1993) et de certaines enzymes de phase II (glutathion *S*-transférase, UDP-glucuronosyltransférase) (Nebert *et al.*, 1990). Ces HAP constituent souvent des contaminants de l'environnement (ex. TCDD) et se retrouvent dans la fumée de cigarette ou dans les aliments grillés au charbon de bois. Néanmoins, des composés comme le 3-méthylcholanthrène ou la β -naphthoflavone produisent le même effet. Le mécanisme

d'induction de la transcription de ces gènes passe par la fixation du ligand (un HAP) sur un dimère protéique localisé dans le cytoplasme des cellules. Ce dimère est constitué d'un AhR (aryl hydrocarbon receptor) associé à deux protéines de choc thermique (hsp 90). La fixation du ligand sur le AhR entraîne la dissociation des hsp 90, la translocation du AhR dans le noyau et sa dimérisation avec l'ARNT (Ah receptor nuclear translator). Le complexe AhR/ARNT se lie alors avec des séquences XREs (xenobiotic responsive elements) localisées dans la région "enhancer" des gènes inductibles. Cette liaison induit une altération locale de la chromatine qui facilite l'accès du promoteur et l'activation de la transcription. La revue (Whitlock *et al.*, 1996) détaille l'ensemble de ces étapes du mécanisme d'induction.

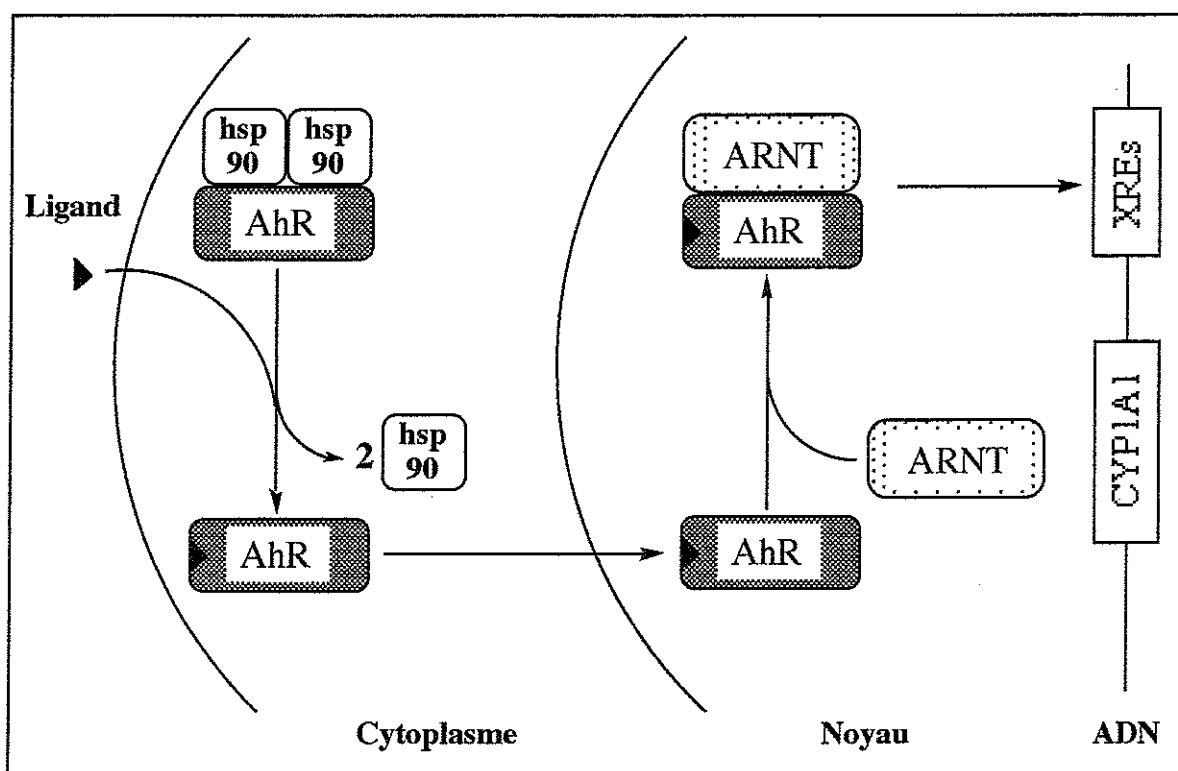


Figure I-6. Induction de la transcription du CYP1A1 par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (ligand). Adapté de Whitlock *et al.*, 1996.

Le phénobarbital, d'autres barbiturates, la phénytoïne, le dichlorodiphényltrichloroéthane ou l'oxyde de trans-stilbène induisent chez l'animal de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments. Ainsi ces composés augmentent le niveau d'expression de l'époxyde hydrolase, de certaines UDP-glucuronosyltransférases et de certains cytochromes P450 (principalement les CYP2B1 et CYP2B2 mais aussi les CYP2A, 3A et 2C) chez le rat (Okey, 1990 ; Waxman *et al.*, 1992 ; Gonzalez *et al.*, 1993). L'induction des CYP2B provient d'une stimulation intense de l'activité transcriptionnelle (de 20 à 50 fois le niveau basal) (Atchinson *et al.*, 1983 ; Pike *et al.*, 1985). Chez l'homme, le phénobarbital induit également les CYP2C8 et CYP2C9 (Morel *et al.*, 1990).

Introduction

Les hypolipémiants comme le **clofibrate** provoquent la prolifération des peroxysomes mais induisent également les cytochromes de la sous-famille 4A (Rao *et al.*, 1991 ; Gibson, 1992). Ces phénomènes dépendent de l'interaction de ces composés avec un récepteur PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor). Cette interaction stimule alors l'activité transcriptionnelle (Bars *et al.*, 1993).

Les antibiotiques macrolides tels que le **triacétyloléandomycine (TAO)**, l'érythromycine, ou la rifampicine ainsi que des glucocorticoïdes de synthèse (Dexaméthasone), des antiglucocorticoïdes (prégnénolone 16 α -carbonitrile) induisent l'expression des gènes des P450 de la sous-famille 3A (Watkins *et al.*, 1985 ; Molowa *et al.*, 1986 ; Wright *et al.*, 1994). Cette induction est due à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle (Simmons *et al.*, 1987).

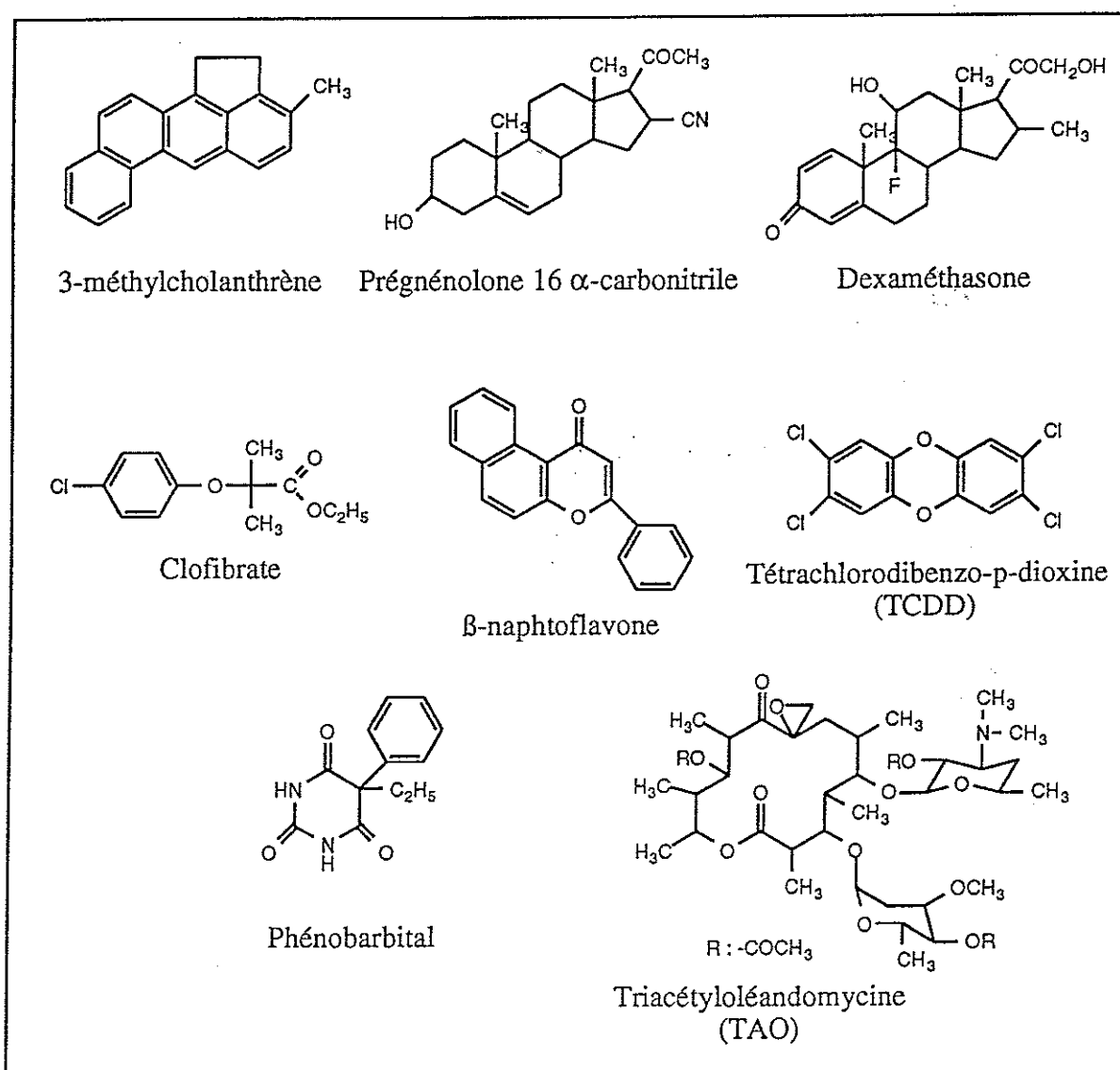


Figure I-7. Structure des principaux inducteurs de cytochromes P450.

Introduction

Inhibition

Il existe différents mécanismes d'inhibition des cytochrome P450. En effet, certains composés peuvent complexer le fer II ou le fer III du groupement prosthétique de l'enzyme (Battioni *et al.*, 1983). Le monoxyde de carbone se ligande avec le fer II et empêche ainsi la fixation de l'oxygène moléculaire. Des composés contenant un groupe pyridine ou imidazole comme la métyrapone ou le miconazole se fixent quant à eux sur le fer III de l'hème (de Montellano, 1995). De nombreux médicaments peuvent également former des adduits avec le P450 qui les a préalablement activé. Ce point sera abordé plus en détail dans la section *Inactivation métabolique du cytochrome P450* page 21.

I-3 Formation de métabolites réactifs

Dans la plupart des cas, les enzymes de phase I et II permettent de détoxiquer et d'éliminer les composés étrangers qui pénètrent dans l'organisme. Cependant, il arrive que la fonctionnalisation de xénobiotiques et en particulier de médicaments conduise à leur **bioactivation** et leur confère ainsi une **toxicité** à l'origine d'effets secondaires (Park *et al.*, 1994; 1995). Plus rarement, les enzymes de phase II peuvent aussi aboutir à la formation de conjugués capables de réagir avec les macromolécules de l'organisme (Bailey *et al.*, 1996).

I-3-1 Activation métabolique de médicaments et P450

Les métabolites réactifs formés à partir de médicaments durant la phase I proviennent principalement d'une activation dépendante des P450 hépatiques (Park *et al.*, 1995). Ces derniers peuvent en effet générer des entités réactives durant le métabolisme oxydatif ou réductif qu'ils catalysent.

Voie oxydative

La voie oxydative est celle qui est le plus souvent mise en cause dans les mécanismes de bioactivation. Elle aboutit à la formation d'**intermédiaires électrophiles** instables (Mansuy *et al.*, 1991). Ces derniers sont susceptibles de se lier de façon covalente à des sites nucléophiles présents sur des constituants cellulaires tels que les protéines, les lipides ou l'ADN (Dansette *et al.*, 1990 ; Cribb *et al.*, 1996 ; Gil *et al.*, 1995 ; Maggs *et al.*, 1995). Ainsi l'oxydation du chloroforme fournit du phosgène qui est un agent alkylant responsable de troubles hépatiques et rénaux (figure I-8) (Pohl, 1979; 1981).

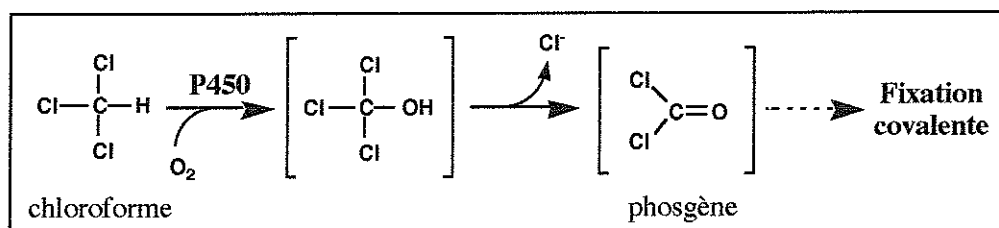


Figure I-8. Métabolisme oxydatif du chloroforme.

De même, la bioactivation de l'acétaminophène par les P450 hépatiques (1) aboutit à la formation de *N*-acétyl-*p*-benzoquinone imine (figure I-9) (Miner *et al.*, 1979 ; Corcoran *et al.*, 1980 ; Dahlin *et al.*, 1984). Ce métabolite électrophile se lie aux groupements lysines et cystéines des protéines (2) et entraîne une toxicité hépatique importante (Holtzman, 1995 ; Hinson *et al.*, 1995 ; Nelson, 1995). Les P450 assurent également l'oxydation d'alcènes ou arènes comme par exemple la carbamazépine ou la phénytoïne en époxydes capables de se lier aux constituants cellulaires (Madden *et al.*, 1996 ; Lillibridge *et al.*, 1996). La fixation de ces époxydes sur l'ADN foetal serait responsable du pouvoir tératogène de ces composés anticonvulsivants. De plus, la formation d'époxydes à partir de ces composés est également à l'origine du syndrome d'hypersensibilité aux anti-convulsivants.

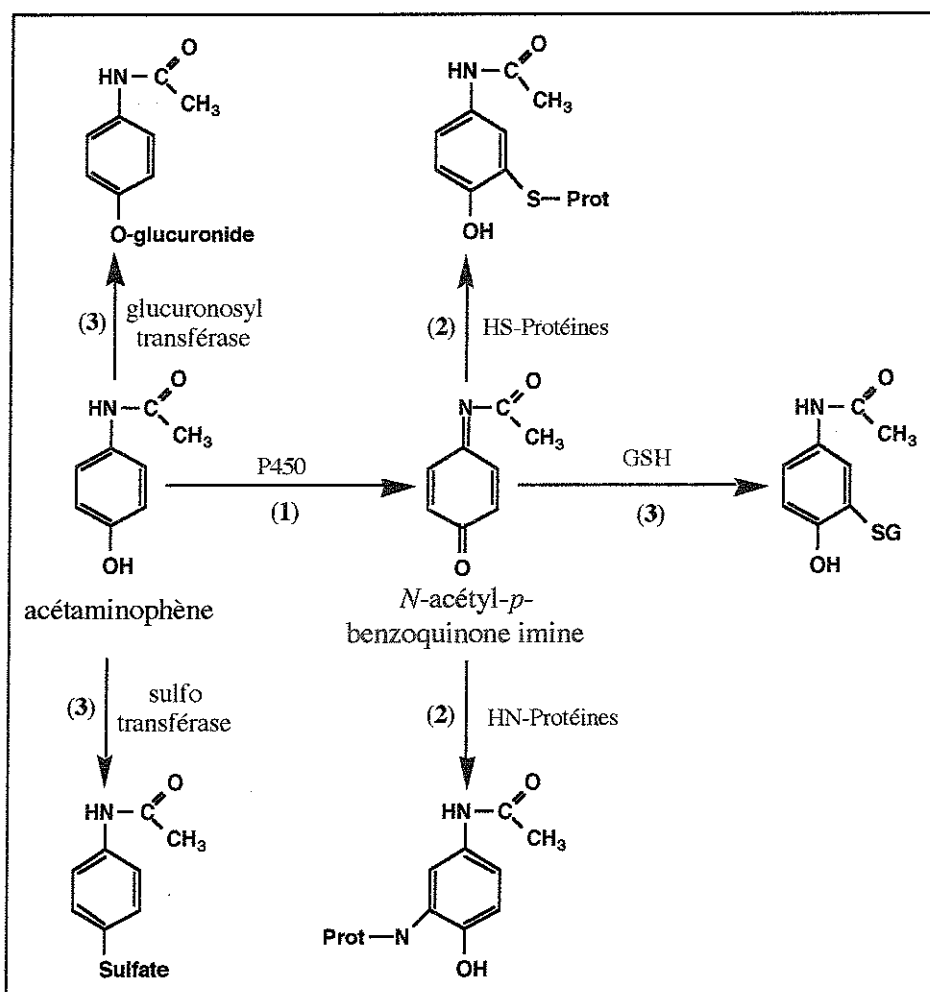


Figure I-9. Métabolisme de l'acétaminophène.

Voie réductrice

La forme réduite du P450 génère des radicaux libres au cours de la deshalogénéation de divers alcanes chlorés comme l'halothane, le tétrachlorure de carbone ou le chloroforme (Sipes *et al.*, 1976 ; Pohl, 1979). La formation de radicaux libres à partir de ces composés est à l'origine de la toxicité hépatique dose-dépendante de ces composés. De même, l'hépatotoxicité de la tacrine pourrait également dériver de la formation de quinones méthides (Madden *et al.*, 1995) dépendante du CYP1A2 (Becquemont *et al.*, 1996). En effet, les quinones méthides rentrent dans des cycles rédox qui génèrent des radicaux libres. Les **radicaux libres** générés dans l'organisme peuvent réduire l'oxygène moléculaire en l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$. L'anion superoxyde est un intermédiaire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou de radicaux hydroxyles ($\bullet OH$) beaucoup plus réactifs. Ces derniers peuvent initier un **stress oxydatif** par réaction avec des chaînes d'acides gras polyinsaturés (peroxydation lipidique) ou des groupements sulfhydryl (diminution du stock de GSH disponible) (Ade *et al.*, 1994 ; Mehendale *et al.*, 1994 ; Awad *et al.*, 1996 ; Durak *et al.*, 1996).

La NADPH cytochrome P450 réductase réduit également certains médicaments porteurs de fonctions quinones ou des nitro-arènes comme le nilutamide (Berson *et al.*, 1991 ; Kedderis, 1996) en radicaux libres (figure I-10).

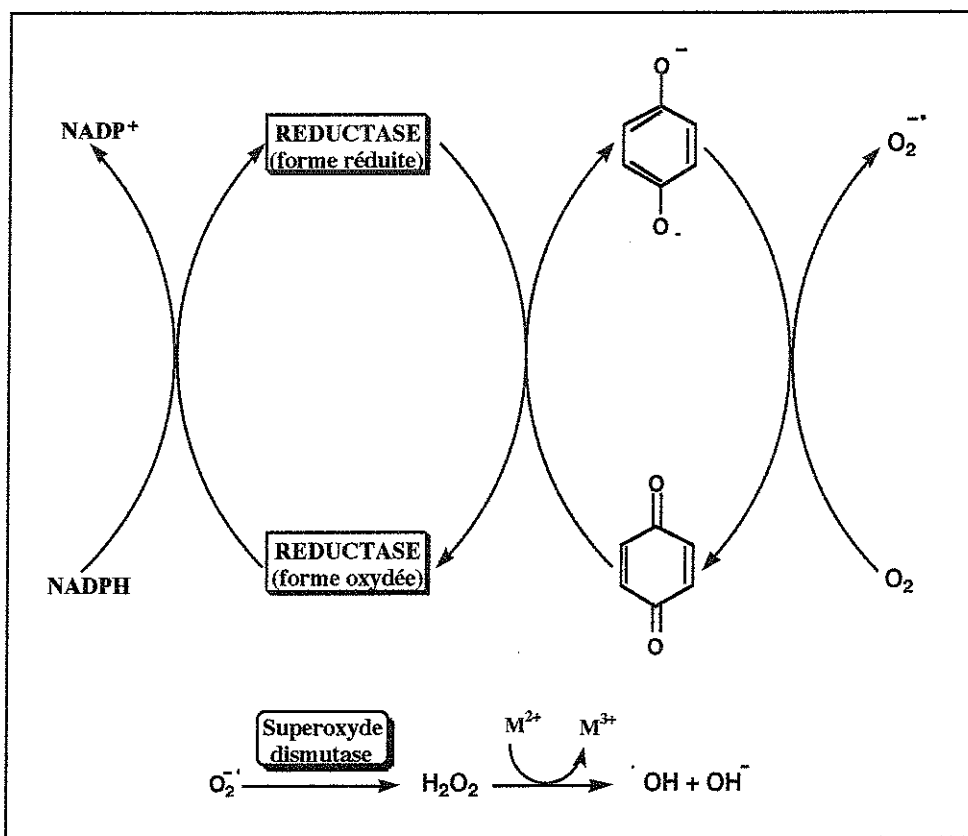


Figure I-10. Réduction d'une quinone en semiquinone par une NADPH cytochrome P450 réductase et cycle redox conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène. M: métal.

I-3-2 Mécanismes de protection

Inactivation métabolique du cytochrome P450

Certains métabolites électrophiles générés par les P450 possèdent une telle réactivité qu'ils se fixent directement sur des résidus nucléophiles présents à l'intérieur du site actif de l'enzyme (Kunze *et al.*, 1993 ; Lopez-Garcia *et al.*, 1994). Cette réaction inactive le P450 impliqué dans le métabolisme du médicament et limite par conséquent la formation des métabolites réactifs (Labbe *et al.*, 1989 ; Mehendale *et al.*, 1994). La fixation de ces derniers peut s'effectuer sur des résidus nucléophiles présents soit **sur la partie héminique** soit **sur l'apoprotéine** du P450. Ainsi, la seule présence d'une double ou triple liaison terminale, comme dans le sécobarbital, le fluroxène ou l'éthynylestradiol, suffit à inactiver un P450 par alkylation d'un azote du groupe prosthétique (de Montellano, 1984; 1986 ; He *et al.*, 1996). Il se forme alors des pigments verts hépatiques constitués par les adduits sur la protoporphyrine IX du cytochrome (de Montellano *et al.*, 1995). La dihydralazine est pour sa part responsable de la fixation covalente de l'hème sur apoprotéine du CYP1A2 (Bourdi *et al.*, 1994). Certains composés halogénés comme le chloramphénicol (Halpert, 1981 ; Kraner *et al.*, 1994) ou ceux possédant une liaison C=S ou P=S (parathion) (Butler *et al.*, 1993 ; Murray *et al.*, 1995) inactivent les P450 par modification de résidus nucléophiles essentiels présents au niveau du site actif.

Détoxication des espèces réactives de l'oxygène

L'organisme dispose de deux enzymes capables de réduire le peroxyde d'hydrogène formé par la superoxyde dismutase. Il s'agit de **la glutathion peroxydase** et de **la catalase** (figure I-11). La réduction du peroxyde d'hydrogène en eau ou celle des radicaux peroxy lipidiques en alcool par la glutathion peroxydase consomme du glutathion réduit (Kedderis, 1996). La régénération de ce dernier fait intervenir la glutathion réductase qui rétablit ainsi l'équilibre glutathion réduit/glutathion oxydé. **La vitamine E**, présente dans les membranes cellulaires, permet, elle aussi de réduire les radicaux lipidiques formés lors d'un stress oxydatif. La vitamine C intervient ensuite dans sa régénération.

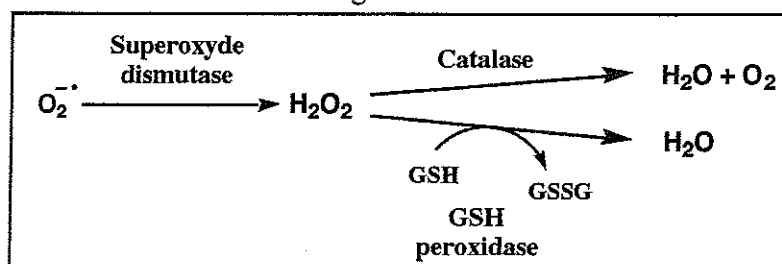


Figure I-11. Mécanismes de détoxication des espèces réactives de l'oxygène.

Transformation en métabolites stables

Les époxydes d'alcènes ou d'arènes générés par les P450 microsomaux sont dégradés sur place ou dans le cytosol par les époxydes hydrolases présentes dans ces deux compartiments.

Les mécanismes de conjugaison réalisés principalement dans le cytosol permettent l'inactivation de la plupart des métabolites électrophiles issus de la phase I (Manautou *et al.*, 1994). Le **glutathion**, par son caractère à la fois nucléophile et réducteur, possède un rôle primordial dans la capacité de détoxification de la cellule ((3) figure I-9) (Meister *et al.*, 1983 ; Reed, 1990). Une déplétion en glutathion suite à un jeûne (Jaeger *et al.*, 1974), un état de malnutrition ou à une production massive de métabolites électrophiles peut favoriser l'apparition de la toxicité d'un médicament (Rafeiro *et al.*, 1994). Les mécanismes de conjugaison aboutissent très généralement à l'élimination de conjugués stables. Néanmoins, il arrive que les réactions de phase II participent également à la formation de précurseurs d'entités réactives capables de réagir avec les macromolécules cellulaires.

I-3-3 Activation métabolique et enzymes de phase II

Les réactions de phase II sont susceptibles de favoriser l'apparition de métabolites réactifs après conjugaison de molécules endogènes à certains médicaments. Ainsi, l'addition de glutathion sur les alcanes halogénés dans le foie fournit des conjugués qui subissent une hydrolyse extrahépatique pour donner des conjugués à la cystéine. L'activation ultérieure de ces conjugués par **la voie de la β -lyase rénale** est probablement à l'origine des pouvoirs toxiques et mutagènes des alcanes halogénés (Anders *et al.*, 1988 ; 1992). De même, la toxicité rénale du trichloroéthylène provient vraisemblablement de sa conjugaison initiale avec le glutathion dans le foie (Dekant *et al.*, 1992). L'hydrolyse du conjugué dichlorovinyl-cystéine correspondant par les β -lyase rénales fournit soit un thioacyl chloré soit un thiocétène responsable de la formation d'adduits (figure I-12) (Kenna *et al.*, 1995 ; Elfarrar *et al.*, 1986). La bioactivation chez le rat de conjugués Composé A-cystéine par les β -lyases rénales explique également la néphrotoxicité du Composé A, un produit de dégradation du sévoflurane (Jin *et al.*, 1995 ; Spracklin *et al.*, 1996). L'hépatotoxicité du clofibrate observée au cours d'études cliniques semble dériver de son **conjugué acyl glucuronide** (Stogniew *et al.*, 1982 ; Bailey *et al.*, 1996). L'acyl glucuronide du diflunisal forme également des adduits protéiques dans de nombreux organes : foie, reins, intestin, vessie, muscles squelettiques (Dickinson *et al.*, 1993). Cette formation d'acyls glucuronides avec plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens pourrait intervenir dans l'idiosyncrasie de l'hépatotoxicité observée avec cette classe de médicaments (Boelsterli *et al.*, 1995 ; Zia-Amirhosseini *et al.*, 1995 ; Bailey *et al.*, 1996 ; Kato *et al.*, 1996).

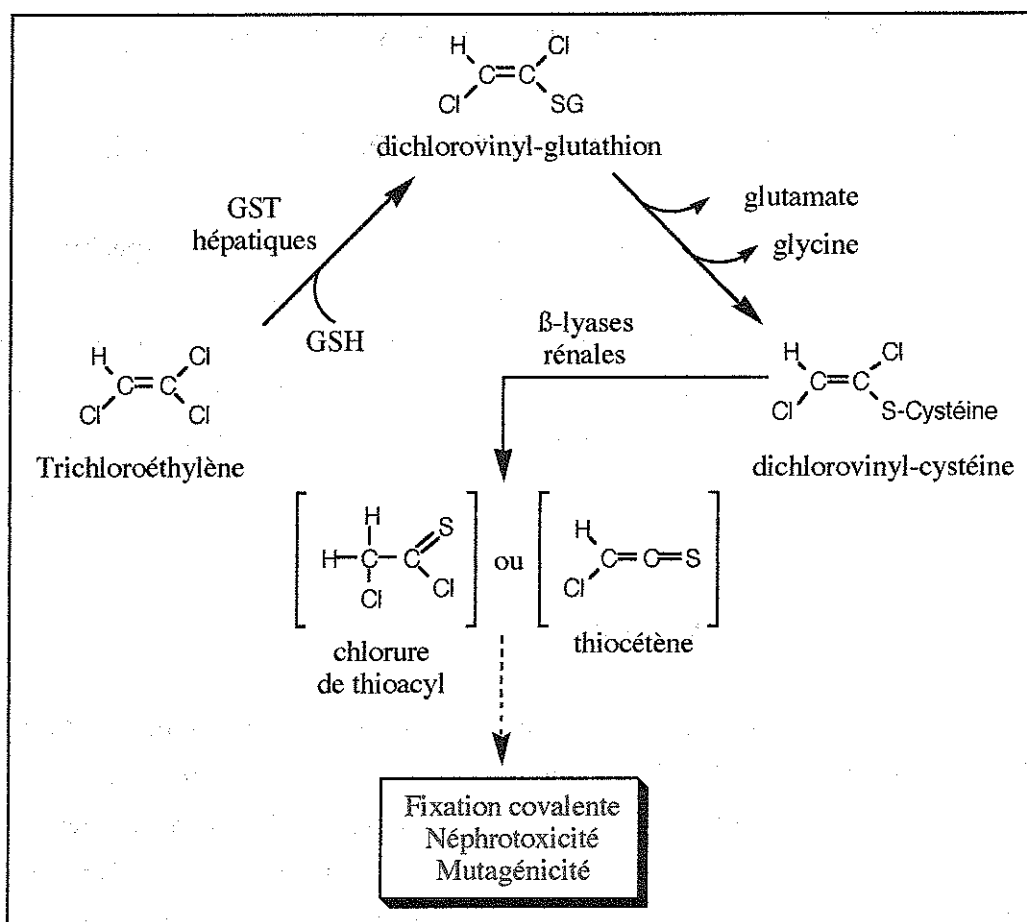


Figure I-12. Activation métabolique du trichloroéthylène par la voie de la β-lyase rénale. GST: glutathion S-transférase.

I-3-4 Réaction des métabolites *in situ*

Le foie constitue une cible privilégiée des métabolites instables formés durant les phases I et II. Ce phénomène s'explique par le rôle prépondérant de cet organe dans les biotransformations de médicaments et par l'instabilité importante de la plupart des métabolites réactifs générés (Willson, 1991). Ces derniers se lient de façon majoritaire sur les macromolécules présentes à proximité de leur lieu de formation (Breen *et al.*, 1982). Plus précisément, les atteintes hépatiques causées par les médicaments se localisent généralement dans la **région centrolobulaire** (Zone acinale 3) (Willson, 1991). Cette hétérogénéité des lésions s'explique par une concentration plus importante en P450 (Moody *et al.*, 1985), une quantité plus faible en GSH (Kedderis, 1996) ainsi qu'une plus basse tension en oxygène des hépatocytes centrolobulaires (Willson, 1991 ; Kedderis, 1996). Les hépatites aiguës liées à la prise de médicaments se divisent en deux types selon le mécanisme impliqué : les hépatites dites toxiques et les hépatites à médiation immunitaire.

II Les hépatites aiguës médicamenteuses

II-1 Aspects cliniques, biochimiques et histologiques

Les symptômes accompagnant les hépatites aiguës sont relativement non spécifiques. Les personnes atteintes peuvent ressentir des nausées, présenter une asthénie, de l'anorexie et des douleurs abdominales (Horsmans, 1993). Les hépatites aiguës médicamenteuses se divisent en 3 groupes caractérisés par des critères biochimiques distincts (Larrey, 1995). L'élévation en nombre de fois la limite supérieure (N) des activités sériques de l'alanine aminotransférase (ALAT) et des phosphatases alcalines constitue le premier critère. Le second correspond au rapport (R) de ces deux types d'activités.

II-1-1 Les hépatites cytolytiques

Les atteintes hépatiques cytolytiques se caractérisent par une activité sérique de l'ALAT qui dépasse 2 N ou par un rapport $R \geq 5$. La nécrose hépatocytaire présente généralement un caractère diffus mais peut se localiser à la région centrolobulaire. Ces atteintes cytolytiques s'accompagnent souvent de la présence d'un infiltrat inflammatoire non spécifique de type lymphocytaire. L'arrêt du traitement responsable de l'hépatite conditionne l'amélioration rapide des symptômes et une disparition des anomalies biologiques. Cependant, une insuffisance hépatocellulaire caractérisée par un ictère, une encéphalopathie et de troubles de la coagulation peut suivre l'hépatite aiguë initiale. Lorsque l'encéphalopathie se déclare dans les 15 jours qui suivent l'apparition de l'ictère, l'hépatite est de type **fulminante**. Par contre, quand le délai dépasse les 15 jours, l'hépatite est qualifiée de **subfulminante**. Ces deux types d'hépatites évoluent de façon peu favorable et se caractérisent par des taux de mortalité très élevés (90%). L'établissement d'une **hépatite chronique active** (durée des anomalies > à 3 mois) constitue une autre forme d'évolution possible de certaines des atteintes hépatiques médicamenteuses aiguës cytolytiques. L'hépatite chronique active se caractérise par la présence d'un infiltrat inflammatoire mononucléé au niveau des espaces portes et par une nécrose des hépatocytes périportaux. L'inflammation et la nécrose peuvent également s'étendre aux lobules hépatiques.

II-1-2 Les hépatites cholestatiques

Les atteintes hépatiques cholestatiques se définissent par une augmentation isolée de l'activité sérique des phosphatases alcalines à plus de 2 N ou par un rapport $R \leq 2$. Ce type d'atteinte regroupe 2 sous-types de cholestases hépatocytaires aiguës : la cholestase pure relativement rare (dérivés hormonaux) et l'hépatite cholestatique, rencontrée le plus souvent. Cette dernière s'accompagne fréquemment de douleurs abdominales parfois intenses, de fièvre, de frissons

ainsi que de signes d'hypersensibilité. Les lésions touchent les canaux biliaires qui contiennent des pigments biliaires et les hépatocytes qui subissent une légère nécrose. De plus, des cellules mononuclées et des éosinophiles infiltrent souvent les espaces portes et les zones nécrosées. L'interruption du traitement responsable entraîne la disparition des symptômes ainsi qu'une normalisation des critères biochimiques sans séquelle. Néanmoins, une cholestase chronique peut également s'établir suite à une destruction des canaux biliaires.

II-1-3 Les hépatites mixtes

Les atteintes hépatiques mixtes se caractérisent par une augmentation simultanée des activités sériques de l'ALAT et des phosphatases alcalines. Cette double élévation se traduit par des rapports R compris entre 2 et 5. Les atteintes hépatiques mixtes possèdent les manifestations cliniques, biologiques et histopathologiques des hépatites cytolytiques et cholestatiques. Elles n'évoluent que de façon exceptionnelle vers l'hépatite fulminante et le pronostic est généralement favorable avec une absence de séquelles ultérieures.

II-2 Les hépatites médicamenteuses toxiques

II-2-1 Caractéristiques

Les hépatites médicamenteuses toxiques proviennent généralement d'une production massive de métabolites réactifs qui déborde les mécanismes de protection décrits précédemment (Pessayre, 1995). Elles possèdent des caractéristiques communes qui sont les suivantes:

- brièveté du délai entre le début du traitement et la survenue de l'hépatite,
- effet dose dépendant. Les fortes doses ou les surdosages du médicament favorisent la formation des métabolites réactifs impliqués dans la pathologie,
- pas de manifestations d'hypersensibilités (fièvre, rash, lymphadénopathie),
- après guérison, la réadministration du médicament à faibles doses ne s'accompagne pas de la réapparition des troubles.

Les hépatites médicamenteuses toxiques peuvent être reproduites chez l'animal si les voies métaboliques humaines sont analogues chez l'espèce considérée.

II-2-2 Origine des lésions

Dans de rares cas, le médicament lui-même est capable d'initier la nécrose cellulaire. Par exemple, la chlorpromazine et d'autres phénothiazines ou les sels d'érythromycine agissent comme des surfactants (Seeman, 1972). Ces composés provoquent la lyse des hépatocytes par rupture de la membrane plasmique.

Néanmoins, l'apparition de la plupart des hépatites toxiques médicamenteuses semble dériver de la **formation excessive de métabolites réactifs** et/ou de **l'incapacité de l'organisme à les éliminer**. La génération non contrôlée d'entités alkylantes ou/et oxydantes au niveau cellulaire peut perturber les fonctions vitales de la cellule à plusieurs niveaux. Un mécanisme important d'hépatotoxicité médicamenteuse semble lié à une rupture de l'homéostasie calcique par alkylation de certaines protéines régulatrices, par l'établissement d'un stress oxydatif ou par une anoxie (Pessayre, 1995 ; Kedderis, 1996).

II-2-3 Conséquences d'une rupture de l'homéostasie calcique

Le calcium intervient dans de nombreuses fonctions physiologiques cellulaires. Un transport actif, dépendant d'une ATPase, maintient un gradient de concentration en calcium entre l'intérieur (10^{-7} M) et l'extérieur (10^{-3} M) de la cellule. Dans la cellule, le calcium est séquestré dans les mitochondries, le réticulum endoplasmique, le noyau et par des protéines qui le lient (Nicotera *et al.*, 1990). Les mitochondries agissent comme un système tampon en régulant les fluctuations de la quantité de calcium intracellulaire. Les quinones, les radicaux hydroperoxydes ainsi que les métaux tels que le fer et le cadmium favorisent un relargage du calcium mitochondrial (Kedderis, 1996). De même, la perturbation des fonctions mitochondriales par alkylation de protéines spécifiques ou plus généralement par oxydation des thiols protéiques conditionne une baisse d'ATP dans la cellule (Pessayre, 1995). Cette baisse d'ATP entraîne une chute de l'activité de la pompe à calcium ATP dépendante et une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Reed, 1990). Ainsi, un métabolite formé lors de l'activation oxydative du diclofénac semble entraîner une déplétion du stock d'ATP mitochondrial avant d'entraîner la mort cellulaire (Pondosa *et al.*, 1995). Néanmoins, dans ce cas aucune augmentation de la concentration en calcium intracellulaire n'a été décelée. De même, le chloroforme entraîne une entrée de calcium à partir de la membrane plasmique et perturbe l'homéostasie calcique. L'hépatotoxicité induite par la tacrine pourrait également provenir de la baisse d'ATP induite par ce médicament (Berson *et al.*, 1996).

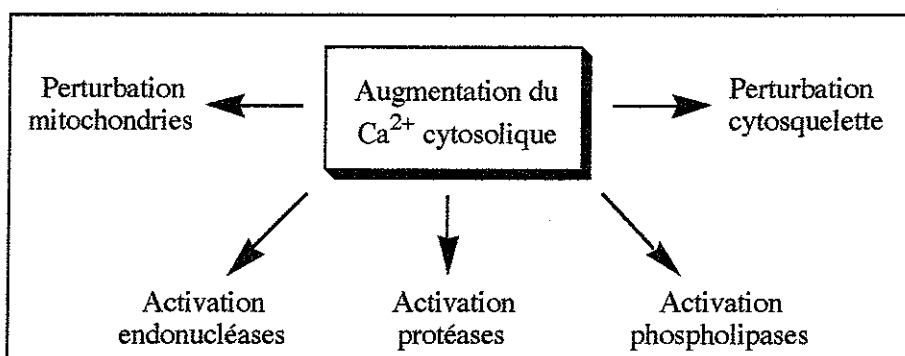


Figure II-1. Processus Ca^{2+} dépendants impliqués dans la cytolyse.

Une rupture de l'homéostasie calcique entraîne l'activation de nombreuses enzymes impliquées dans la lyse cellulaire (figure II-1) (Nicotera *et al.*, 1990). Ainsi, une concentration intracellulaire en calcium élevée active des phospholipases calcium ou calmoduline dépendantes. Ces phospholipases stimulent le métabolisme de l'acide arachidonique et perméabilisent la membrane plasmique. L'augmentation du calcium intracellulaire provoque également l'activation des endonucléases qui dégradent l'ADN. Ainsi l'acétaminophène (Ray *et al.*, 1990 ; Shen *et al.*, 1992) ou la ménadione (McConkey *et al.*, 1988) induisent la formation de cassures doubles brins au sein de l'ADN avant la mort de la cellule par rupture de la membrane plasmique. Le calcium régule aussi l'état de polymérisation des protéines qui constituent le cytosquelette, une augmentation de sa concentration fragilise donc le réseau des microfilaments (Nicotera *et al.*, 1990). Cette **perturbation du cytosquelette** peut aboutir à des altérations des canaux de la membrane plasmique, à une augmentation de sa perméabilité ou encore à sa rupture. Une protéase neutre activée par le calcium intervient dans la **rupture de la membrane de l'hépatocyte**.

II-2-4 Origine multifactorielle des hépatites médicamenteuses toxiques

L'administration d'un médicament à doses thérapeutiques ne provoque généralement pas d'atteinte hépatique massive car l'organisme détoxique efficacement les métabolites réactifs générés. Néanmoins, la fréquence d'apparition d'hépatites aiguës liées à une prise de médicaments à la posologie correcte est de l'ordre de 1/10 000 à 1/100 000. Cette fréquence fait apparaître l'idiosyncrasie et l'origine multifactorielle des hépatites médicamenteuses toxiques. La variabilité d'expression des P450 (précédemment décrite), qu'elle qu'en soit la cause, influe sur la quantité de métabolites réactifs générés au cours des réactions de phase I. De même, certaines enzymes de phase II comme la *N*-acétyl transférase 2 (NAT2), l'UDP-glucuronosyl transférase 1 (UDPGT1) ou l'époxyde hydrolase sont également sous contrôle génétique (Krynetski *et al.*, 1996). Leur expression chez les métaboliseurs lents peut donc moduler la quantité de métabolites détoxiqués. Il faut également noter que l'acide valproïque et le valpromide sont des inhibiteurs de l'époxyde hydrolase (Kerr *et al.*, 1989). Le disulfiram (Ploemen *et al.*, 1996) ou les diurétiques comme l'acide éthacrynique (Ahokas *et al.*, 1984 ; Ploemen *et al.*, 1993) inhibent pour leur part les glutathion S-transférases. Ces inhibitions enzymatiques peuvent entraîner l'apparition d'une toxicité si les enzymes de phases I ou II impliquées dans l'élimination d'un médicament sont inhibées par un autre administré simultanément. Des facteurs nutritionnels exercent aussi une influence sur la capacité de l'organisme à détoxiquer des métabolites électrophiles ou oxydants. En effet, le jeûne ou la dénutrition appauvrissent les réserves hépatiques en glutathion diminuant en conséquence les possibilités de piégeage par ce composé.

II-3 Les hépatites médicamenteuses à médiation immunitaire

II-3-1 Caractéristiques

Les hépatites médicamenteuses qui mettent en jeu le système immunitaire possèdent des caractéristiques communes:

- rareté de la survenue de l'hépatite (1 cas sur 10 000 à 35 000 patients),
- pas d'effet dose apparent. Les troubles survenant pour des doses thérapeutiques,
- délais d'apparition relativement longs (plusieurs semaines à plusieurs mois),
- manifestations d'hypersensibilité (fièvre, rash, lymphadénopathie, etc...),
- parfois présence d'anticorps spécifiques dans le serum des malades,
- après guérison, la réadministration du médicament (même à faible dose) ou la prise d'un composé de structure chimique proche se manifeste généralement par une aggravation des troubles cliniques qui surviennent alors dans des délais plus brefs.

Les trois dernières caractéristiques de ce type hépatites médicamenteuses mettent en évidence le caractère spécifique et à mémoire de la réponse immunitaire mise en oeuvre.

II-3-2 Implication du système immunitaire

Immunité naturelle et immunité spécifique

Le système immunitaire se présente sous deux aspects fonctionnels : l'immunité non spécifique ou naturelle et l'immunité spécifique ou à mémoire. Malgré cette dualité apparente, les deux types d'immunité sont en fait largement intriqués en raison des diverses coopérations cellulaires qui s'établissent (Roitt, 1994). **Les leucocytes constituent les cellules effectrices de l'immunité naturelle et de l'immunité spécifique.** Ils se divisent en deux grandes catégories. La première comprend les cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages) et les cellules Natural Killer (NK). Cette première catégorie de cellules est principalement impliquée dans l'immunité naturelle. La seconde catégorie de leucocytes : les lymphocytes, sont à l'origine de l'immunité spécifique. En effet, les lymphocytes sont capables de reconnaître des antigènes (Ag) déterminés. C'est cette fonction de **reconnaissance ciblée** qui confère la spécificité de la réponse immunitaire. Les lymphocytes matures vivent plusieurs années et confèrent ainsi la **mémoire** de l'immunité spécifique. **Les hépatites médicamenteuses immunoallergiques ou autoimmunes font principalement intervenir l'immunité spécifique.** Nous allons donc préciser les mécanismes impliqués dans la reconnaissance ciblée de l'Ag par les lymphocytes.

Reconnaissance de l'Ag par les lymphocytes B

Les lymphocytes B reconnaissent les Ag par l'intermédiaire d'anticorps (AC) qui agissent comme des récepteurs. Chaque lymphocyte B est programmé pour ne fabriquer qu'un seul type d'AC qui est ancré à la surface de la membrane de la cellule. Ainsi, un lymphocyte B porte à sa surface environ 10^5 molécules de cet AC (Roitt, 1994). Un Ag ne se lie qu'aux récepteurs qui possèdent la plus forte affinité. De cette façon, l'Ag sélectionne les lymphocytes B qui lui sont spécifiques (figure II-2). La liaison Ag/AC active les cellules B qui prolifèrent et se différencient en plasmocytes qui sécrètent tous des AC identiques à celui qui a servi de récepteur à l'Ag. Parallèlement, une fraction de la population de lymphocytes B qui ont réagi avec l'Ag se transforment en cellules mémoires. Les Ag reconnus par les cellules B ne subissent pas de modification préalable contrairement aux Ag reconnus par les cellules T.

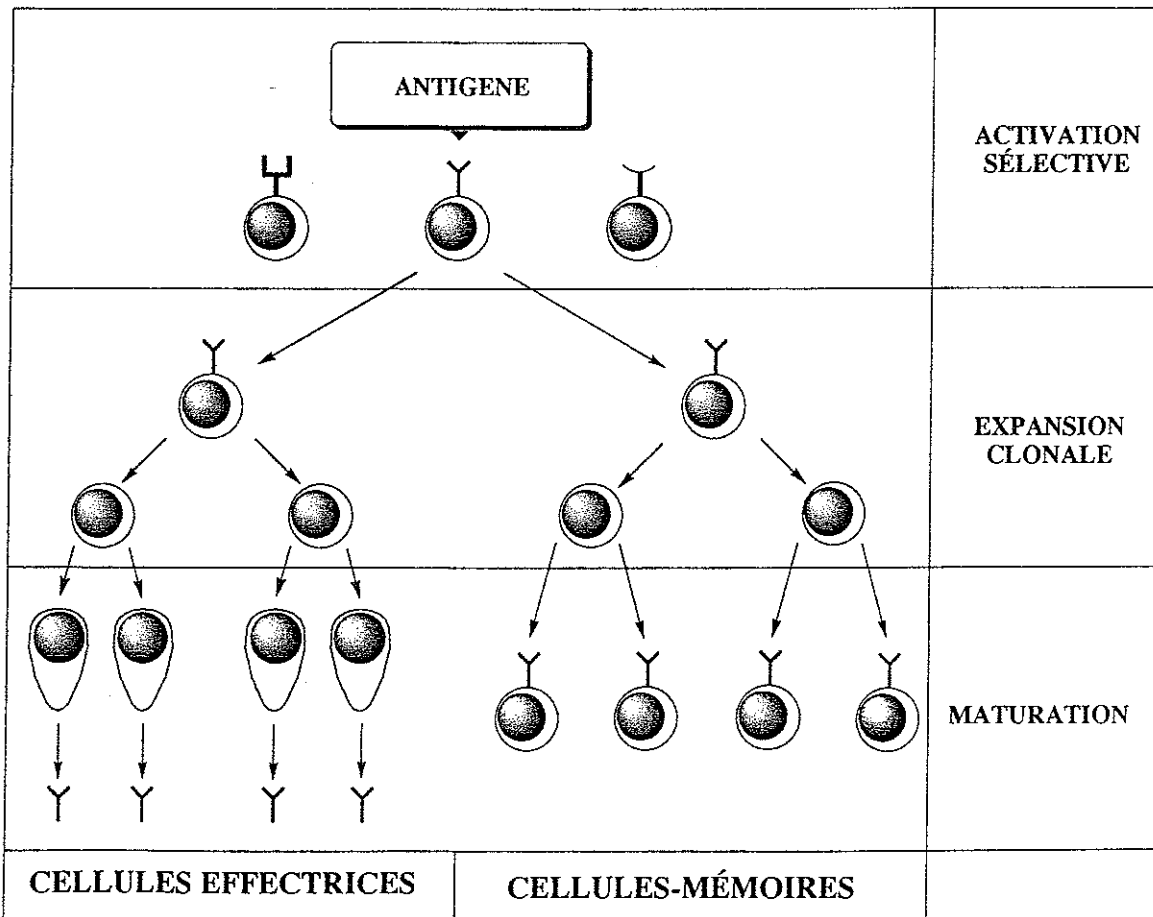


Figure II-2. Sélection et prolifération clonale des lymphocytes B qui possèdent l'affinité la plus importante pour l'antigène.

Reconnaissance de l'Ag par les lymphocytes T

La reconnaissance de l'Ag par les lymphocytes T s'effectue **par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire : le TCR** (T cell receptor). L'Ag reconnu par les lymphocytes T diffère de celui reconnu par les cellules B ; il consiste en de courts peptides antigéniques provenant de la dégradation intracellulaire de protéines. Ces fragments antigéniques sont associés avec des molécules de classe I ou II codées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le TCR interagit avec l'association Ag/molécule de classe I ou II exprimée à la surface des cellules. Pour cette raison, **la reconnaissance des lymphocytes T est qualifiée de restreinte au CMH** (Germain *et al.*, 1993).

Les molécules de classe I du CMH sont exprimées par toutes les cellules nucléées de l'organisme (Roitt, 1994). Elles s'associent à de courts peptides de 8 ou 9 acides aminés et les complexes Ag/molécules de classe I formés sont alors présentés à la surface des cellules (Rammensee *et al.*, 1993 ; Engelhard, 1994). Ils sont reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (Tc) qui expriment le marqueur de surface CD8. La protéine CD8 favorise la reconnaissance de l'Ag par la cellule Tc ainsi que la transduction du signal (Roitt, 1994). **Les octa ou nonapeptides présentés proviennent généralement de la dégradation de protéines endogènes au niveau des protéasomes** (Benham *et al.*, 1995).

Les molécules de classe II du CMH sont exprimées par des cellules spécialisées dans la présentation de l'Ag (CPAg) quand celles-ci sont activées (Brown *et al.*, 1993) . Il s'agit principalement des monocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules de Langerhans et lymphocytes B. Les molécules de classe II du CMH s'associent à des peptides de 15 acides aminés en moyenne (Rötzschke *et al.*, 1994 ; Sinigaglia *et al.*, 1994). Les complexes Ag/molécules de classe II formés sont alors exprimés à la surface des CPAg où ils sont reconnus par les lymphocytes T auxiliaires aussi désignés T Helpers (Th). Ces lymphocytes expriment le marqueur de surface CD4 qui intervient dans la reconnaissance du complexe Ag/molécule de classe II par le TCR ainsi que dans la transduction du signal (Roitt, 1994). **Les peptides présentés par les CPAg dérivent généralement de protéines exogènes. Cependant, un pourcentage non négligeable de peptides proviennent également de protéines exprimées à la surface des CPAg** (Rötzschke *et al.*, 1994 ; Aichinger *et al.*, 1995). Ces dernières internalisent les deux types de protéines par endocytose et les dégradent ensuite au niveau de compartiments endosomaux tardifs et prélysosomiaux (Germain *et al.*, 1993 ; Barnes *et al.*, 1995).

Activation complète, partielle ou nulle des lymphocytes T

De nombreux complexes peptide/molécule du CMH différents peuvent stimuler un même clone de cellules T (Kersh *et al.*, 1996). En effet, seulement 3 à 4 chaînes latérales d'acides aminés du peptide sont accessibles au TCR (Madden *et al.*, 1991 ; Gautam *et al.*, 1994). De plus, le TCR est en fait un récepteur de faible affinité (Davis *et al.*, 1993). La flexibilité de reconnaissance du TCR entraîne un classement des complexes peptide/molécule du CMH en trois catégories selon qu'ils induisent une activation complète, partielle ou nulle des cellules T (Kersh *et al.*, 1996). L'activation complète des lymphocytes T déclenche à la fois leur prolifération et la sécrétion de lymphokines caractéristiques par ces cellules. Une activation partielle provoque la sécrétion de cytokines mais ne constitue pas une condition suffisante pour provoquer la prolifération des cellules T (figure II-3) (Evavold *et al.*, 1991). La première catégorie de ligands regroupe les **agonistes vrais** et les **agonistes faibles**. Les agonistes induisent une activation complète des cellules T. Les complexes peptide/molécule du CMH qui s'imbriquent exactement dans le TCR constituent les agonistes vrais. Ceux qui s'imbriquent de façon moins parfaite correspondent aux agonistes faibles. La seconde catégorie de ligands comprend les **agonistes partiels** et les **antagonistes** regroupés sous l'appellation générale 'ligands modifiés'. Ce terme désigne les complexes peptide/molécule du CMH qui présentent une modification d'un seul acide aminé par rapport à l'agoniste correspondant. Les ligands modifiés induisent une activation incomplète des cellules T. La troisième catégorie rassemble les ligands nuls. Il s'agit des complexes peptide/molécule du CMH qui n'interagissent pas avec le TCR des cellules T et qui par conséquent n'induisent pas leur activation.

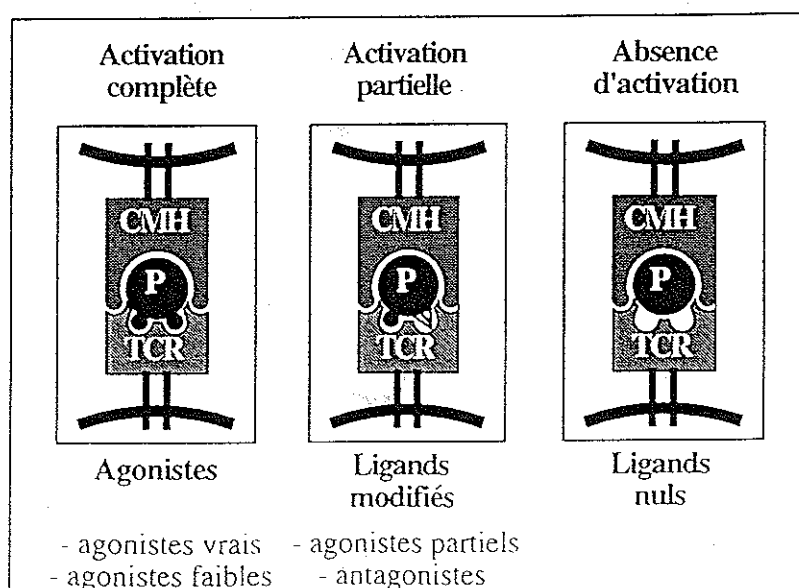


Figure II-3. Conséquences de l'interaction entre le TCR et des ligands peptide/molécule du CMH.

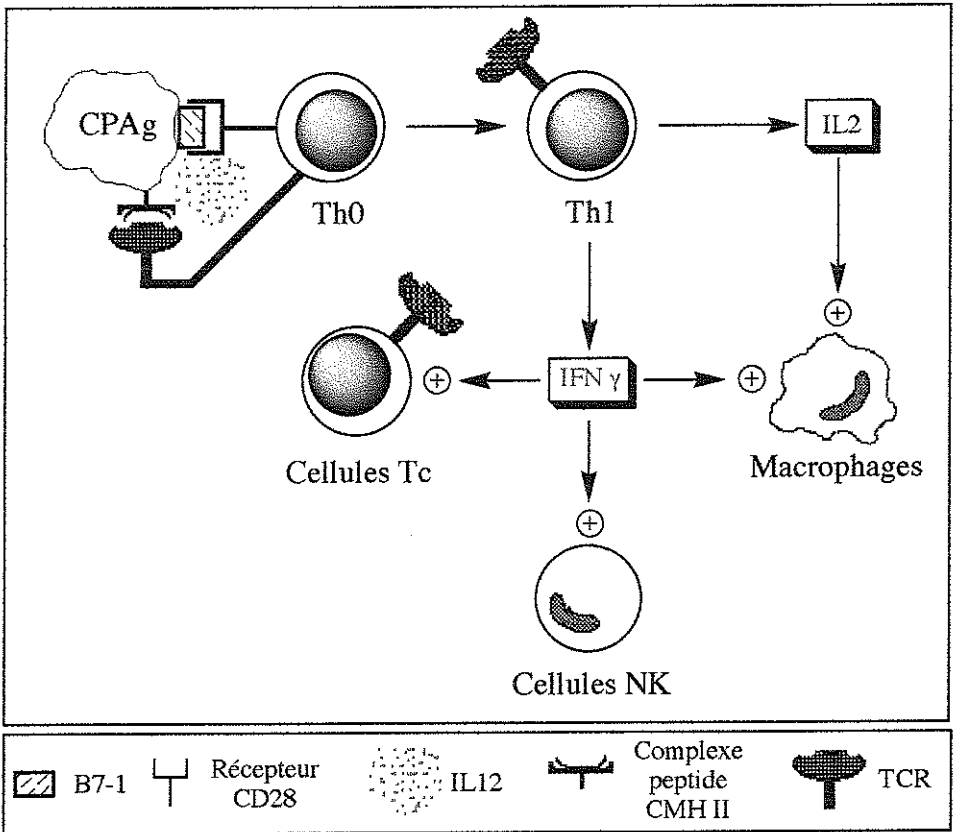


Figure II-4. Établissement d'une immunité cellulaire sous l'influence des interactions CPAg/Th0 et d'un microenvironnement local d'IL12.

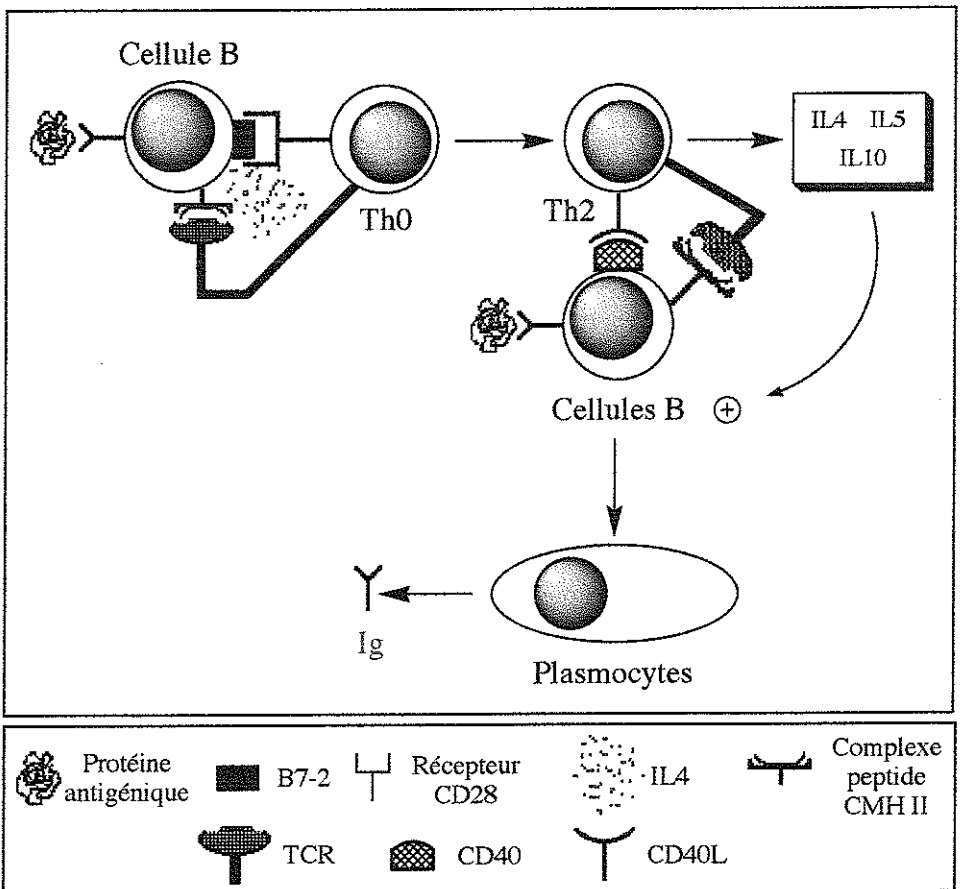


Figure II-5. Établissement d'une immunité humorale sous l'influence des interactions CPAg/Th0 et d'un microenvironnement local d'IL4.

Les deux signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T naïfs

La reconnaissance du complexe Ag/molécule de classe I ou II par le TCR de cellules T naïves ne constitue en fait que le **premier signal** nécessaire à leur activation.

L'interaction entre des protéines costimulatrices exprimées à la surface des CPAg, et leurs récepteurs présents sur les lymphocytes T constitue le **second signal** (Liu *et al.*, 1992).

Ainsi, les molécules B7-1 et B7-2 portées par les CPAg interagissent avec le récepteur CD28 des cellules T (Lenschow *et al.*, 1996). Ces interactions ne sont pas spécifiques de l'Ag et leur seule présence ne suffit pas pour déclencher l'activation des cellules T (Janeway Jr. *et al.*, 1994). Par contre, l'absence de tels contacts cellulaires induit la mort (Webb *et al.*, 1990) ou l'anergie (Jenkins *et al.*, 1988) des lymphocytes T qui ne reçoivent que le premier signal. Une cellule T anergique ne peut être stimulée même si elle reçoit les deux signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T naïfs. Une fois activées, les cellules T ne requièrent plus la présence du second signal pour exercer leurs fonctions effectrices (Janeway Jr. *et al.*, 1994). La reconnaissance des deux signaux par des lymphocytes Th naïfs induit leur différenciation en Th0. Les Th0 initient, orientent et entretiennent la majorité des réactions immunitaires liées à la reconnaissance d'un Ag.

Coopérations cellulaires

Une immunité spécifique de type cellulaire ou de type humoral (médiée par les AC) va s'établir suite à l'activation des cellules Th0. L'orientation de la réponse immunitaire va dépendre des cytokines présentes dans le microenvironnement, en particulier L'IL-12 et L'IL-4 ainsi que des contacts entre les CPAg et les cellules Th0.

L'IL-12 favorise en effet la différenciation des cellules Th0 en Th1 (figure II-4). De plus, l'expression de la molécule costimulatrice B7-1 à la surface des CPAg oriente la différenciation des Th0 vers le sous-type Th1. Les Th1 sécrètent principalement de l'IL-2 et de l'IFN γ . L'IL-2 active les macrophages et monocytes. L'IFN γ amplifie l'expression des molécules de classe I du CMH et induit l'apparition de celles de classes II sur de nombreuses cellules (dont les hépatocytes), favorisant par conséquent la présentation de l'Ag. L'IFN γ active également les cellules Tc, les cellules NK et les macrophages (Roitt, 1994). **Le développement des Th1 s'accompagne donc de l'apparition d'une immunité de type cellulaire.**

L'IL-4 oriente la différenciation des cellules Th0 en Th2 (figure II-5). L'expression de la molécule costimulatrice B7-2 à la surface des CPAg oriente la différenciation des Th0 vers le sous-type Th2. Les Th2 sécrètent alors principalement de l'IL-4, IL-5 et IL-10. Ces cytokines induisent l'activation des cellules B en plasmocytes produisant des anticorps et favorisent donc la **mise en place d'une immunité de type humoral**. L'activation des

cellules B en plasmocytes dépend également de l'interaction entre la protéine CD40 portée par les cellules B et son récepteur CD40L présent sur les cellules Th2 (von Boehmer, 1994 ; Laman *et al.*, 1996 ; Lenschow *et al.*, 1996).

Le type d'immunité qui se développe dans le cas des hépatites médicamenteuses immunoallergiques ou autoimmunes n'est généralement pas connu. Cependant, cette question est élucidée dans le cas des dermatites induites par les sels d'or employés dans les affections rhumatismales ou les atteintes rénales dues aux sels de mercure. En effet, de nombreuses études chez l'animal ont permis de mettre en évidence une immunité humorale dépendante des cellules Th2 (Goldman *et al.*, 1991 ; Prigent *et al.*, 1995 ; Saoudi *et al.*, 1995).

II-3-3 Mécanismes postulés des hépatites à médiation immunitaire

Une molécule doit posséder une masse moléculaire d'au moins 1000 Da pour pouvoir stimuler le système immunitaire. La plupart des médicaments sont donc incapables d'induire une réponse immune *per se*. Néanmoins, certains d'entre eux peuvent se fixer de façon covalente sur des constituants biologiques.

L'hypothèse de base consiste à considérer que le médicament subit une activation au cours de son métabolisme au sein de l'hépatocyte. L'entité réactive formée alkyle alors certaines protéines intracellulaires des hépatocytes. Ces dernières sont relarguées lors du "turn-over" (physiologique ou non) de la cellule.

Dans le cas de l'établissement d'une réponse de type cellulaire (figure II-6), les protéines hépatocytaires subissent une phagocytose par les cellules de Kupffer, des macrophages localisés dans les sinusoides hépatiques (1). Ces protéines alkylées sont ensuite dégradées en peptides qui sont exprimés en association avec les molécules de classe II du CMH à la surface des cellules de Küppfer (2). Les complexes peptides alkylés/ classe II sont reconnus par le TCR de certains lymphocytes Th1 qui sont alors activés (Boelsterli *et al.*, 1995 ; Pessayre, 1995). Les cytokines sécrétées par les Th1 activés peuvent également induire l'expression des molécules de classe II sur les hépatocytes (3) (Roitt, 1994). Ces derniers deviennent donc capables de présenter des peptides alkylés aux Th1. Les cytokines sécrétées par les Th1 activent préférentiellement les Tc (4), macrophages et cellules NK (5) responsables de la cytolysse (Kägi *et al.*, 1996 ; Vély *et al.*, 1996).

l'IFN γ , sécrété par les cellules Th1, pourrait augmenter l'expression des molécules de classe I sur les hépatocytes. La présentation accrue de peptides alkylés aux Tc par des hépatocytes pourraient ainsi favoriser la nécrose cellulaire.

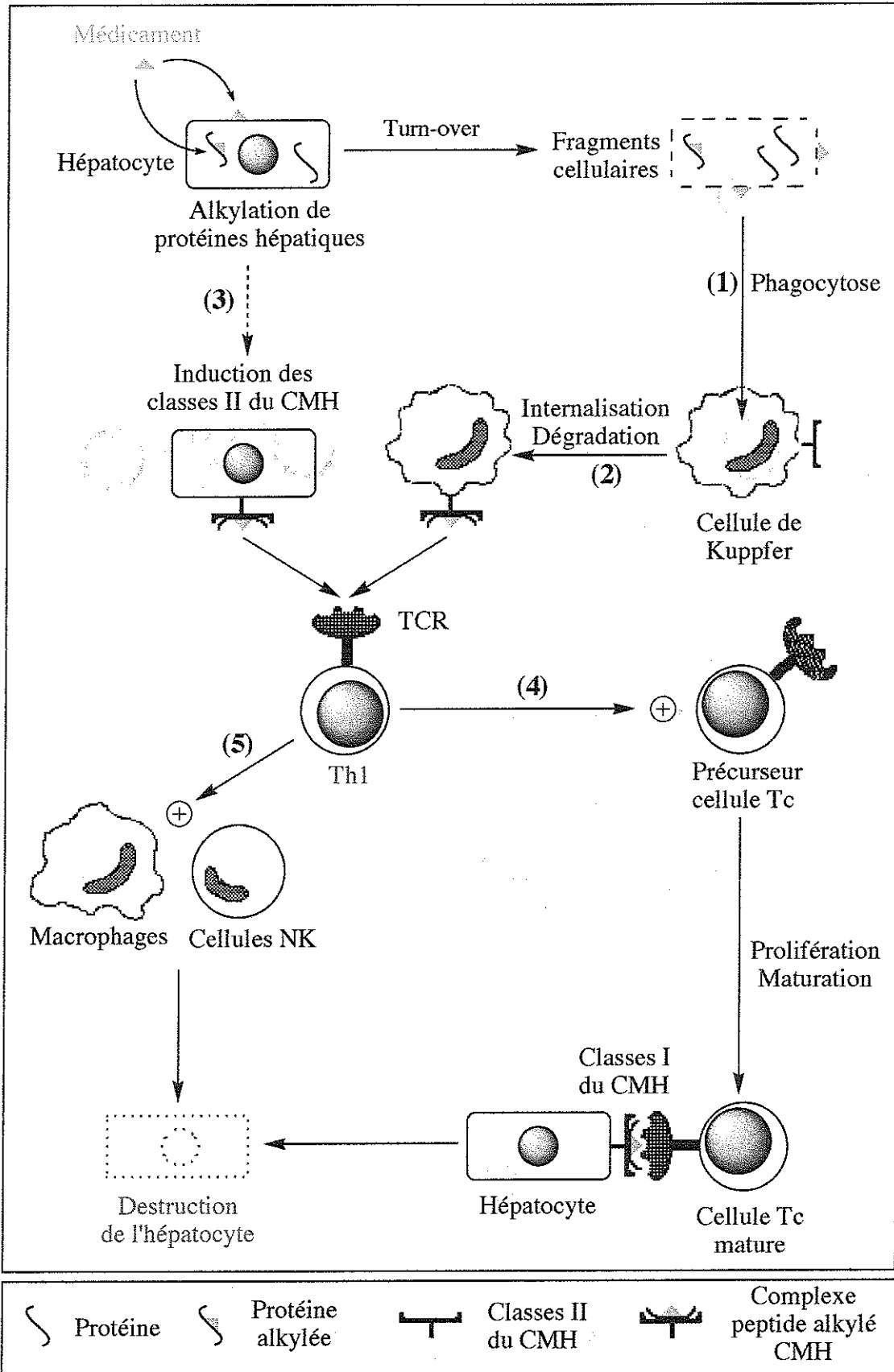


Figure II-6. Mécanisme de la cytotoxicité à médiation cellulaire.

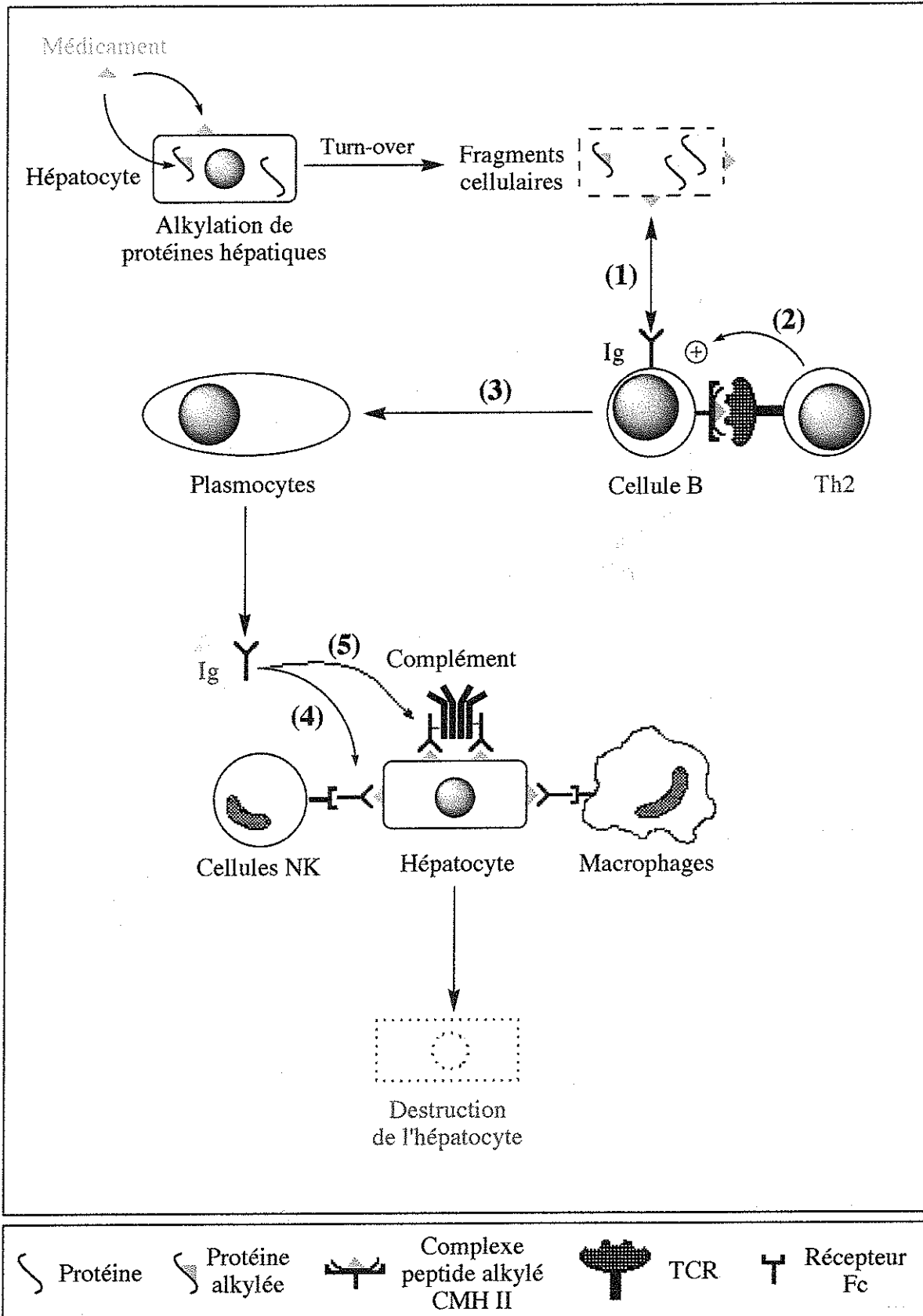


Figure II-7. Mécanisme de la cytotoxicité à médiation humorale.

Dans l'hypothèse d'une immunité humorale (figure II-7), certains lymphocytes B peuvent reconnaître les adduits protéiques relargués lors du turn-over de l'hépatocyte *via* leur AC membranaire (1) (Boelsterli *et al.*, 1995 ; Pessayre, 1995). Ces adduits sont alors internalisés, dégradés et présentés en association avec des molécules de classe II à la surface des lymphocytes B. Les Th2 qui reconnaissent les complexes peptides alkylés/classe II stimulent ces clones de cellules B (2) et induisent leur différenciation en plasmocytes (3). Les AC anti-protéines alkylées sécrétés par ces plasmocytes se lient aux adduits exprimés à la surface de l'hépatocyte (4). Cette liaison est reconnue par le récepteur Fc des cellules NK (Vély *et al.*, 1996) et des macrophages (Roitt, 1994) qui détruisent l'hépatocyte. La liaison AC/adduit active également le complément qui participe à la nécrose cellulaire (5). L'ensemble de ces mécanismes de lyse cellulaire est regroupé sous l'appellation ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity).

Dans le cas d'hépatites médicamenteuses autoimmunes, des cellules B autoréactives quiescentes pourraient être impliquées (Pessayre, 1995). Ces dernières pourraient en effet internaliser et dégrader des protéines modifiées par le médicament et libérées lors du turn-over d'hépatocytes. Elles pourraient ensuite présenter les peptides alkylés en association avec des molécules de classe II à des Th2. Ces Th2 activés stimuleraient la prolifération de ces clones de cellules B autoréactives et par conséquent la sécrétion d'autoAC. Ces autoAC pourraient être impliqués dans des mécanismes d'ADCC.

II-3-4 Facteurs influant leur développement

Ce type d'hépatites est caractérisé par une fréquence d'apparition faible, leur développement doit, par conséquent, être sous la dépendance de plusieurs facteurs. Comme nous l'avons vu précédemment, les éléments essentiels de la réponse immunitaire spécifique sont la reconnaissance et la présentation de l'Ag. Plusieurs facteurs peuvent influencer ces deux étapes nécessaires à l'activation des cellules immunocompétentes. En effet, la formation des complexes peptides/classe I ou II dépend de nombreux facteurs modulables par la fixation des médicaments. Ces modulations peuvent entraîner un dérèglement qualitatif et/ou quantitatif des peptides présentés. Les conséquences sont alors la présentation de nouveaux épitopes ou de fragments normalement cryptiques aux Tc ou Th. Les Ag cryptiques sont des peptides qui ne sont pas présentés au système immunitaire dans les conditions physiologiques (Sercarz *et al.*, 1993). Ces Ag ne sont par conséquent pas reconnus comme appartenant au Soi.

Modifications qualitatives des peptides présentés

Les hépatocytes, s'ils sont activés, peuvent devenir des CPAg présentant des peptides alkylés aux cellules effectrices du système immunitaire (Franco *et al.*, 1987). Les fragments présentés par des hépatocytes et par des CPAg spécialisées diffèrent peut-être en raison de lieux

Introduction

de protéolyse distincts. Le médicament pourrait également perturber l'activité protéolytique de la cellule soit directement soit indirectement. Dans le premier cas, certaines protéases seraient alkylées et dans l'autre cas, l'alkylation des protéines à dégrader rendraient certains sites de clivage inaccessibles aux protéases (Bloksma *et al.*, 1995). Ce phénomène pourrait permettre la présentation de peptides cryptiques dans le cas des sels d'or (Griem *et al.*, 1995; 1996). La modification des peptides par le médicament peut également générer de nouveaux épitopes (structures reconnues par le TCR) (Weltzien *et al.*, 1996). Ainsi, de nombreux patients atteints d'hépatites présentent une sensibilisation vis à vis de néoantigènes induits par la fixation covalente d'un médicament. Par exemple, la carbamazépine stimule la prolifération de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ de patients allergiques (Mauri-Hellweg *et al.*, 1995). De même, des anticorps dirigés contre l'halothane (Kenna *et al.*, 1988) ou l'érythromycine (Gomez-Lechon *et al.*, 1996) liés à des protéines hépatiques ont été caractérisés chez des personnes atteintes d'hépatite induite par ces médicaments. La fixation d'un médicament sur certaines protéines peut également perturber le trafic cellulaire et favoriser la présentation de peptides à la surface de la cellule (Kenna *et al.*, 1992 ; Pumford *et al.*, 1993).

Modifications quantitatives des peptides présentés

L'induction, l'inhibition ou le polymorphisme génétique d'expression auxquels sont sujettes les enzymes impliquées dans l'activation des médicaments module la formation des métabolites réactifs. L'insuffisance ou le débordement des mécanismes de détoxification peut également faire varier la quantité des espèces chimiques susceptibles de se fixer sur les protéines. Ces différents phénomènes modulateurs de l'apparition de métabolites réactifs modulent par conséquent la quantité de peptides alkylés.

Autres facteurs

Les nouveaux épitopes ou les fragments normalement cryptiques présentés aux Tc ou Th suite à la fixation du médicament peuvent mimer certains déterminants viraux ou bactériens (Riley *et al.*, 1995). Dans ce cas, un patient préalablement sensibilisé par ces déterminants au cours d'une infection verra ses cellules mémoires restimulées.

Une autre possibilité de mimétisme moléculaire peut également impliquer une similitude entre les nouveaux épitopes induits par le médicament et des déterminants du Soi contre lesquels il existe des cellules B autoréactives (Christen *et al.*, 1993 ; Quaratino *et al.*, 1995). Auquel cas, on retrouverait des autoAC dirigés contre ces mêmes déterminants du Soi dans les sera des patients. Ce type de mimétisme pourrait intervenir dans l'hépatite à l'halothane (Gut *et al.*, 1995).

II-3-5 Exemples

Hépatite induite par l'halothane

L'halothane est un anesthésique halogéné volatil. Il est responsable de deux atteintes hépatiques. La première, relativement fréquente (environ 1 patient sur 4), est modérée et s'accompagne d'une élévation transitoire des taux de transaminases (Kenna *et al.*, 1995). Elle est attribuée à une perturbation mineure des hépatocytes ; son évolution est favorable et ne pose pas de problème clinique. La seconde atteinte hépatique présente les caractéristiques d'une atteinte à médiation immunitaire. Sa fréquence d'apparition est de l'ordre de 1/10 000. La plupart du temps, elle survient après de multiples expositions à l'halothane (75% des cas) (Zimmerman, 1978). Les patients susceptibles sont principalement des femmes (rapport femme/homme 2/1) de plus de 40 ans ou des personnes obèses. Les patients possédant l'allèle HLA A11 semblent présenter une certaine prédisposition à la survenue de l'hépatite (Eade *et al.*, 1981). Cette dernière est sévère, de type aiguë cytolytique, elle atteint le stade fulminant dans plus de 15% des cas. L'issue est alors généralement fatale sauf si une transplantation est effectuée (Zimmerman, 1978).

Les patients atteints de l'hépatite sévère présentent une sensibilisation humorale et cellulaire vis à vis de néoantigènes hépatiques induits par l'halothane. En effet, *in vitro*, ces néoantigènes induisent la migration des leucocytes des patients (Vergani *et al.*, 1978). De plus, leurs sera contiennent des AC dirigés contre de nouveaux Ag exprimés à la surface des hépatocytes. Ces AC sont capables de participer à des réactions d'ADCC *in vitro* (Vergani *et al.*, 1980). Les néoAg induits par l'halothane proviennent du métabolisme oxydatif du médicament. Le CYP2E1, l'enzyme principale impliquée dans l'activation de l'halothane (figure II-8), génère un composé hydroxylé instable (Brown *et al.*, 1995 ; Kharasch *et al.*, 1996). Ce dernier évolue rapidement en un chlorure de trifluoroacétyl capable de réagir avec les groupements amines des lysines des protéines (Kenna *et al.*, 1988).

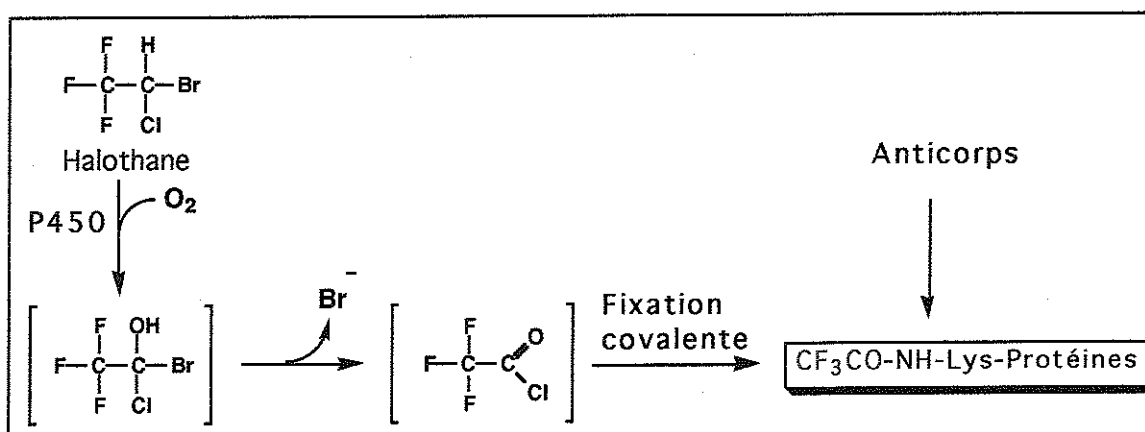


Figure II-8. Métabolisme oxydatif de l'halothane et origine des néoAg.

Des études chez l'animal montrent que l'**halothane forme ainsi des conjugués trifluoroacétylés** dans différents organes (Huwyler *et al.*, 1992a,b ; Heijink *et al.*, 1993). Néanmoins, ces adduits sont principalement exprimés au niveau du foie (Kenna *et al.*, 1990 ; van Pelt *et al.*, 1994) et plus précisément dans le réticulum endoplasmique et à la surface des hépatocytes (Vergani *et al.*, 1980 ; Satoh *et al.*, 1985 ; Kenna *et al.*, 1987). Chez le rat, ces adduits sont divisés en deux groupes distincts identifiés par des techniques différentes.

Le premier groupe d'adduits formés chez le rat, détectable par ELISA mais pas par immunotransfert, est composé de protéines membranaires alkylées (Knight *et al.*, 1994). La nature précise des adduits appartenants à ce groupe est inconnue. Le second groupe correspond à des adduits détectés par immunotransfert (Kenna *et al.*, 1987, 1988, 1992) ; il s'agit principalement de protéines solubles alkylées par l'halothane (voir tableau II-1).

Tableau II-1. Nature des protéines alkylées par l'halothane chez le rat et détectables par immunotransfert.

Masse Moléculaire (kD)	Protéine alkylée	Référence
170	?	(Amouzadeh <i>et al.</i> , 1995)
100	GRP94	(Thomassen <i>et al.</i> , 1990)
82	GRP78	(Davila <i>et al.</i> , 1992)
80	ERp72	(Pumford <i>et al.</i> , 1993)
63	calréticuline	(Butler <i>et al.</i> , 1992)
59	carboxylestérase	(Satoh <i>et al.</i> , 1989)
58	disulfide isomérase (isoforme)	(Bourdi <i>et al.</i> , 1995)
57	disulfide isomérase	(Martin <i>et al.</i> , 1993a)
54	CYP2E1	(Kenna <i>et al.</i> , 1996)

Mis à part le CYP2E1, les protéines alkylées par l'halothane et détectées par immunotransfert ne sont pas impliquées dans son métabolisme, elles sont très abondantes et résident dans le lumen du réticulum endoplasmique. L'expression de ces protéines alkylées à la surface des hépatocytes pourrait être liée à une perturbation du trafic cellulaire induit par l'halothane (Kenna *et al.*, 1992 ; Pumford *et al.*, 1993). Le médicament alkylerait une séquence signal nécessaire à la rétention des protéines dans le réticulum endoplasmique.

Environ 70% des sera des patients atteints de l'hépatite sévère contiennent des AC dirigés contre au moins un des adduits présentés dans le tableau II-1 (Kenna *et al.*, 1988). Les épitopes reconnus comprennent à la fois le motif trifluoroacétique et des déterminants structuraux des protéines porteuses (Kenna *et al.*, 1988). En outre, plus de 90% des sera des patients malades contiennent des autoAC dirigés contre ces mêmes protéines porteuses mais sous leur forme non alkylée (Martin *et al.*, 1990 ; 1993 ; Pumford *et al.*, 1993). Les épitopes reconnus sont alors de type conformationnels et détectés par ELISA.

Certains sera de patients atteints de l'hépatite sévère reconnaissent également les sous-unités dihydrolipoamide acétyl transférases (sous-unités E2) de différentes protéines (Christen *et al.*, 1993; 1994). Le mécanisme impliqué est un mimétisme moléculaire entre les motifs trifluoroacétyl-lysine des protéines alkylées et le groupement acide lipoïque-lysine des sous-unités E2 (Gut *et al.*, 1995). Enfin, 25% des malades possèdent des AC de type anti-LKM₁ (Walton *et al.*, 1976 ; Homberg *et al.*, 1985). Ces anticorps présentent en effet une profil d'immunofluorescence sur coupes d'organes similaire aux anti-LKM₁ (cible antigénique CYP2D6) détectés dans l'hépatite chronique autoimmune de l'enfant. Cependant, la cible antigénique des AC anti-LKM₁ apparaissant dans le cas de l'hépatite à l'halothane n'est pas le CYP2D6.

D'autres anesthésiques halogénés (enflurane, isoflurane et desflurane) sont responsables de l'apparition d'hépatites similaires à l'hépatite sévère à l'halothane (Gunaratnam *et al.*, 1995 ; Martin *et al.*, 1995). Leur incidence est cependant beaucoup plus faible que celle observée pour l'halothane. L'enflurane, l'isoflurane et le desflurane subissent un métabolisme similaire à l'halothane (figure II-9) mais en proportion beaucoup plus faible (Kharasch *et al.*, 1993 ; Clarke *et al.*, 1995 ; Garton *et al.*, 1995). En effet, alors que 20 à 30% de l'halothane administré est métabolisé chez l'homme, seulement 2.3% de l'enflurane, 0.2% de l'isoflurane et 0.01% de desflurane délivrés sont transformés (Martin *et al.*, 1995). Ces différences pourraient expliquer la très faible incidence des hépatites liées à la prise de ces anesthésiques comparé à celle de l'halothane. Néanmoins, certaines des hépatites observées avec ces trois anesthésiques seraient liées à une sensibilisation préalable à l'halothane (Gunaratnam *et al.*, 1995 ; Martin *et al.*, 1995).

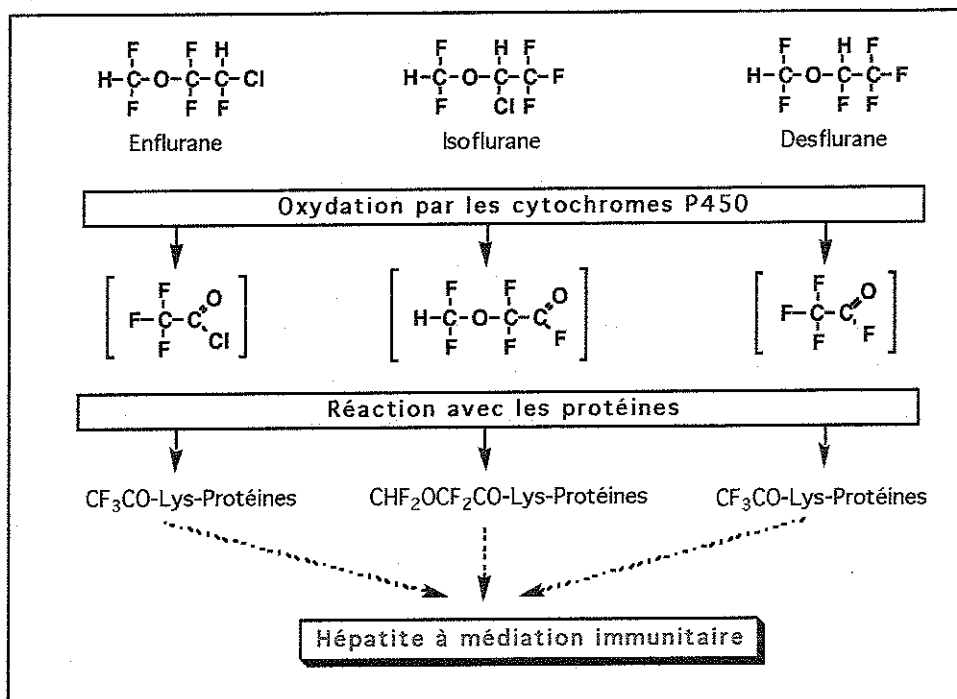


Figure II-9: Métabolisme oxydatif d'anesthésiques de structure proche de celle de l'halothane.

Hépatite induite par l'iproniazide

L'iproniazide est un antidépresseur retiré du marché dans de nombreux pays en raison de son potentiel hépatotoxique. La prise d'iproniazide entraîne une élévation anormale des taux de transaminases chez plus de 20% des patients et un ictère se développe chez environ 1% d'entre eux. La nécrose hépatocellulaire induite par l'iproniazide est parfois suivie d'une cholestase. La plupart du temps, l'évolution est favorable à l'arrêt du traitement. Néanmoins, dans 20% des cas, on observe une aggravation des signes cliniques et l'hépatite devient fulminante (Zimmerman, 1978).

L'iproniazide comporte un motif hydrazine tenu pour responsable du potentiel hépatotoxique du médicament. En effet, l'hydroxylation par les P450 hépatiques de l'iproniazide génère l'isopropyl hydrazine. Ce métabolite peut subir une oxydation et donner naissance à un radical réactif capable d'alkyler les protéines (Podevin *et al.*, 1995). **La nécrose cellulaire observée dans le cadre de l'hépatite est corrélée au taux de fixation covalente de l'iproniazide sur les protéines.** L'activité thérapeutique du médicament est liée à l'inhibition suicide des monoamines oxydases (MAO). Ces enzymes mitochondriales sont impliquées dans la désamination oxydative des neurotransmetteurs. On distingue les MAO A et B par leurs masses moléculaires, leurs substrats et une distribution cellulaire différente. **Les sera de certains patients atteints de l'hépatite induite par l'iproniazide contiennent des autoAC désignés anti-M6** (Homberg *et al.*, 1984, 1985). **La cible antigénique de ces autoAC est la MAO B** (Pons *et al.*, 1996). L'apparition des anti-M6 repose sur une possible oxydation de l'isopropyl hydrazine par les MAO B (Smith *et al.*, 1963). Cette oxydation produirait un radical capable de se lier à la MAO B conduisant ainsi à son inactivation et à la formation d'un adduit. La présentation ultérieure de cet adduit au système immunitaire déclencherait la production des anti-M6 (Pons *et al.*, 1996).

Hépatite induite par les anti-convulsivants

La carbamazépine, la phénytoïne et le phénobarbital sont des composés aromatiques responsables de la survenue d'un syndrome d'hypersensibilité aux anti-convulsivants (Shear *et al.*, 1988 ; Vittorio *et al.*, 1995). La fréquence de ce syndrome est d'environ 1/10 000. Son instauration ne semble pas liée à un sexe ou une tranche d'âge particuliers (Vittorio *et al.*, 1995). Les patients atteints présentent souvent une sensibilisation croisée pour les trois anti-convulsivants qui met en évidence un mécanisme de toxicité commun. Le syndrome se manifeste par un état fébrile (90-100% des patients) suivi par l'apparition de manifestations cutanées plus ou moins sévères (90%) et l'instauration d'une lymphadénopathie (70%) (Shear *et al.*, 1988). Des atteintes multi-organiques sont ensuite observées (60%) avec cependant une nette prédominance d'hépatites (50-60%). Ces dernières constituent la cause la plus courante d'issue fatale du syndrome d'hypersensibilité aux anti-convulsivants (Shear *et al.*, 1988). Le

degré de l'atteinte hépatique est lié à l'intervalle entre l'instauration du syndrome et l'arrêt du traitement. Cependant, l'arrêt du traitement ne conditionne pas toujours une amélioration des signes cliniques.

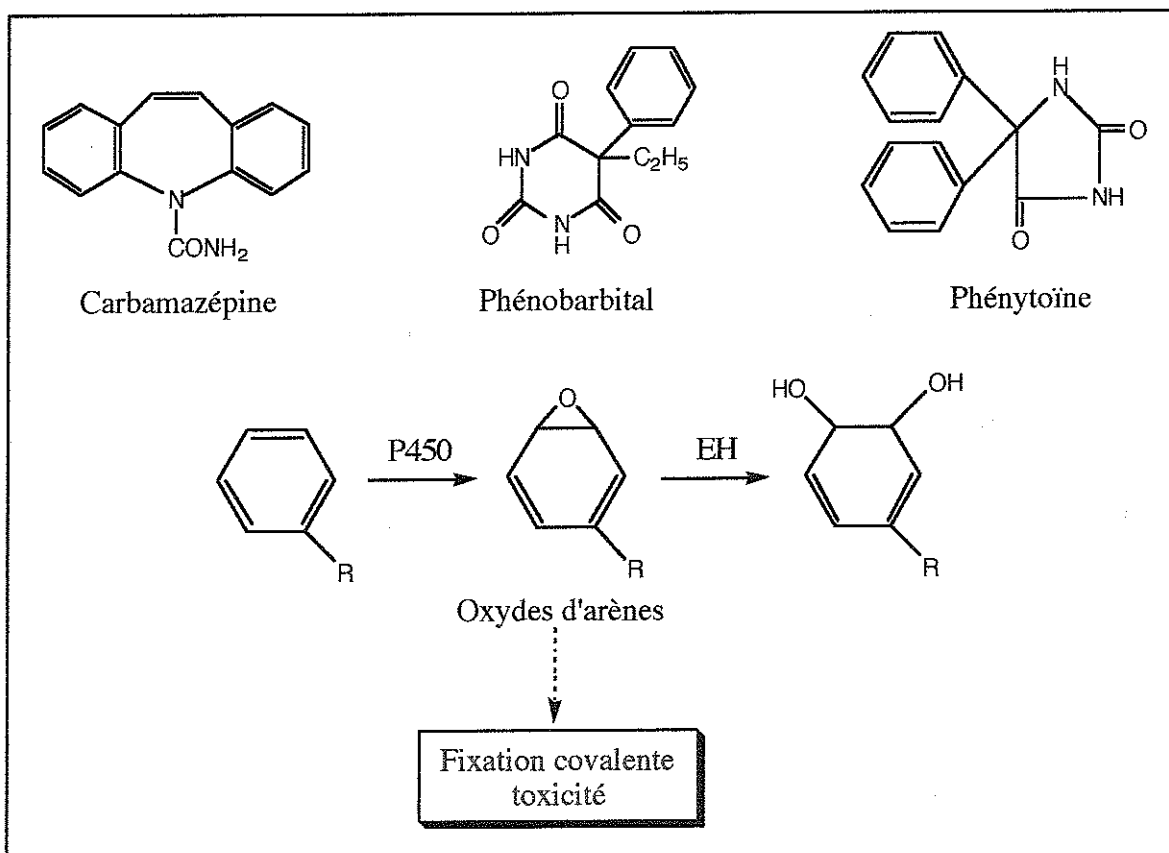


Figure II-10. Structure chimique de 3 anticonvulsivants. Formation d'oxydes d'arènes P450 dépendante et détoxication par l'époxyde hydrolase (EH).

Les anti-convulsivants sont principalement métabolisés par les P450 hépatiques en oxydes d'arènes (figure II-10) (Shear *et al.*, 1988). En particulier, la carbamazépine est prise en charge de façon majoritaire par le P450 3A4 chez l'homme (Kerr *et al.*, 1994 ; Levy, 1995). Les oxydes d'arènes sont capables de se fixer de façon covalente sur les constituants cellulaires (Lillibridge *et al.*, 1996 ; Madden *et al.*, 1996). La détoxication de ces métabolites réactifs est réalisée par l'époxyde hydrolase (EH). Jusqu'à présent, aucune étude n'a permis de mettre en évidence une éventuelle anomalie de l'EH qui expliquerait la sensibilité des patients atteints du syndrome (Davis *et al.*, 1995 ; Green *et al.*, 1995). Les patients atteints du syndrome possèdent des cellules T sensibilisées aux anticonvulsivants (Zakrzewska *et al.*, 1988 ; Mauri-Hellweg *et al.*, 1995). En effet, leurs lymphocytes prolifèrent lorsqu'ils sont exposés à la carbamazépine ou à la phénytoïne.

Le syndrome s'accompagne parfois d'une présence d'autoAC qui reconnaissent différentes protéines microsomales hépatiques dont des P450 (Leeder *et al.*, 1992 ; Pirmohamed *et al.*, 1992). Les P450 3A1 et 3A2 et dans une moindre

mesure le P450 2C11 sont les principales isoformes reconnues chez le rat par ces AC (Riley *et al.*, 1993). L'autoAg humain pourrait être l'orthologue des P450 3A1/3A2 soit le P450 3A4. Cependant, ce dernier n'est pas reconnu par les autoAC (Leeder *et al.*, 1992). Récemment, la cartographie de l'épitope linéaire du P450 3A1 reconnu par les AC présents dans les sera de patients traités aux anti-convulsivants a été réalisée. La séquence déterminée existe dans le CYP3A1 de rat et ne diffère de celle du P450 3A4 que par un seul acide aminé. Un facteur de susceptibilité pourrait donc par exemple provenir d'une mutation sur le gène qui code pour le P450 3A4 chez ces patients. Les mécanismes conduisant à l'apparition des autoAC ainsi que leur implication dans l'hypersensibilité aux anti-convulsivants demeurent méconnus.

Hépatite induite par le diclofénac

Le diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien prescrit pour traiter l'arthrite. Il est responsable de la survenue d'atteintes hépatocellulaires ; il s'agit généralement d'hépatites aiguës (Boelsterli *et al.*, 1995). Une nécrose massive accompagnée d'une hépatite fulminante entraînant la mort du patient est observée dans environ 10% des cas ictériques (Banks *et al.*, 1995). Le sexe féminin (79% des cas) ainsi qu'un âge supérieur à 60 ans (71% des cas) représentent des critères de susceptibilité qui prédisposent à l'apparition de l'hépatite (Banks *et al.*, 1995). Certains patients atteints par l'hépatite induite par le diclofénac présentent des manifestations d'hypersensibilité classiques (fièvre, rash, eosinophilie). En outre, des autoAC anti-muscles lisses ou anti-nucléaires ont été retrouvés dans les sera de quelques patients (Podevin *et al.*, 1995). De nombreuses expériences réalisées *in vitro* confirment l'origine immunoallergique de certaines hépatites liées à la prise de diclofénac. Ainsi, la présence du médicament induit la transformation blastiques de lymphocytes et l'inhibition de la migration de macrophages et de lymphocytes (Stricker *et al.*, 1985). De plus, des souris immunisées avec un conjugué KLH-diclofénac possèdent des cellules T et non T capables de reconnaître des adduits du diclofénac sur des hépatocytes de souris exposés au médicament (Kretz-Rommel *et al.*, 1995). Cette reconnaissance induit l'activation des cellules T et non T et la destruction des hépatocytes. **La fixation du médicament sur les protéines est dépendante de l'UDP-glucuronosyltransférase (UDPGT) microsomale** (Kretz-Rommel *et al.*, 1993; 1994b). Cette enzyme catalyse la conjugaison du groupement carboxylique du diclofénac avec l'acide glucuronique (figure II-11). Les acyls glucuronides formés sont capables de se lier aux protéines suivant deux mécanismes distincts (Hargus *et al.*, 1994 ; Kretz-rommel *et al.*, 1994a). Le premier implique une substitution nucléophile de l'acide glucuronique par les résidus cystéines, tyrosines ou lysines des protéines cibles. Le second mécanisme consiste en une isomérisation en plusieurs étapes suivie d'un réarrangement de l'acyl glucuronide (migration d'acyl). Dans ce dernier cas, l'acide glucuronique participe à la formation de l'adduit par création d'une liaison imine avec un site nucléophile sur les protéines cibles.

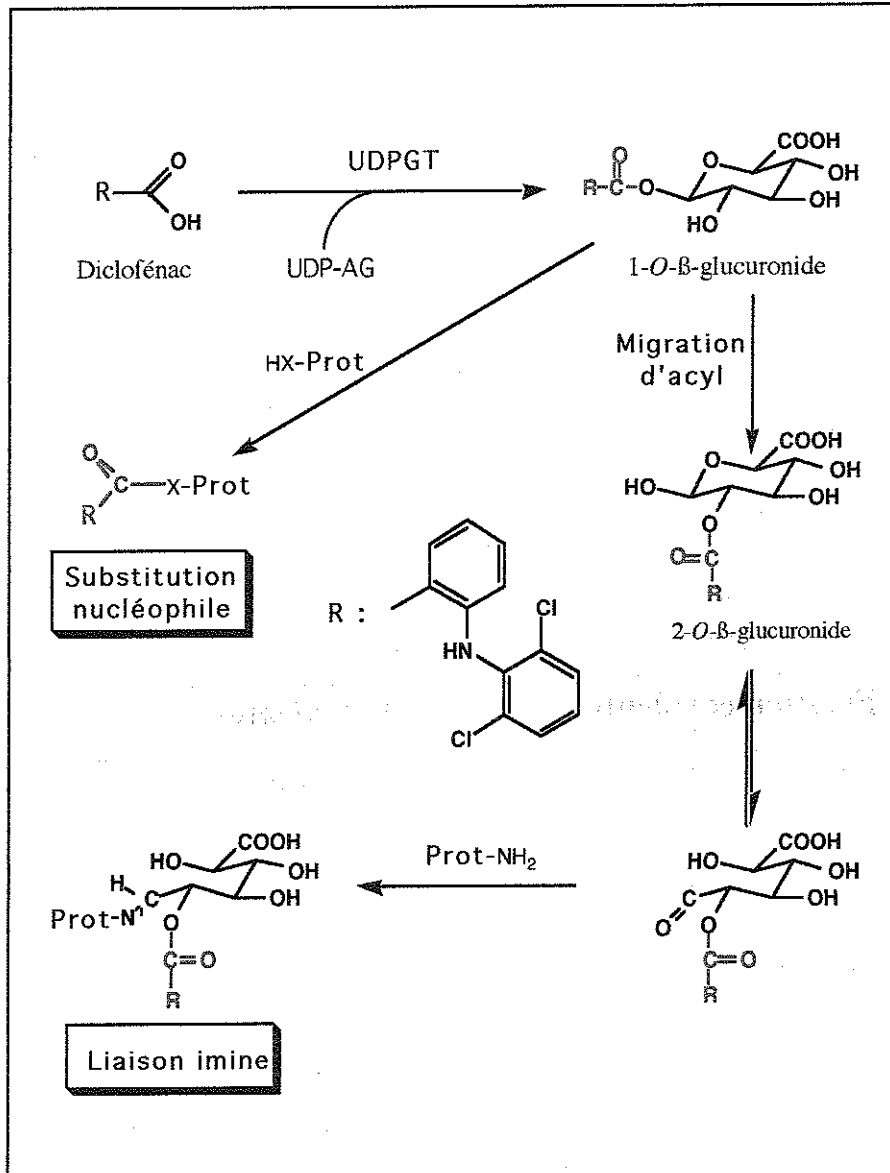


Figure II-11. Mécanismes d'activation du diclofénac par l'UDPGT et fixation covalente du médicament sur les protéines hépatiques. UDP-AG: Uridine diphosphate acide glucuronique. Prot: Protéine; X: S, O, NH.

Hépatite induite par la dihydralazine

La dihydralazine est un anti-hypertenseur responsable d'hépatites aiguës cytolytiques évoluant de façon favorable si le traitement est interrompu (Podevin *et al.*, 1995). La réintroduction du médicament s'accompagne d'une aggravation des signes cliniques (Boccaccio *et al.*, 1987). L'appartenance au sexe féminin (Roschlau, 1986) ainsi qu'un phénotype métaboliseur lent pour la dihydralazine (Schneider *et al.*, 1989) constituent des critères de susceptibilité. L'hépatite à la dihydralazine est associée à la présence d'autoAC dans le sérum des personnes atteintes. Ces autoAC, désignés anti-LM (anti-liver microsomes), sont dirigés contre le cytochrome P450 1A2 (Nataf *et*

al., 1986 ; Bourdi *et al.*, 1990; 1991). L'apparition des anti-LM est expliquée par le métabolisme oxydatif de la dihydralazine (figure II-10) (Bourdi *et al.*, 1994). Le CYP1A2 est responsable de l'activation de la dihydralazine. Les métabolites réactifs formés se fixent de façon covalente sur les protéines et plus particulièrement sur le CYP1A2 lui-même (Bourdi *et al.*, 1994). Cette alkylation relativement spécifique du CYP1A2 constitue probablement une des étapes nécessaires à l'apparition des anti-LM. Ces derniers inhibent d'ailleurs l'activation de la dihydralazine (Bourdi *et al.*, 1994).

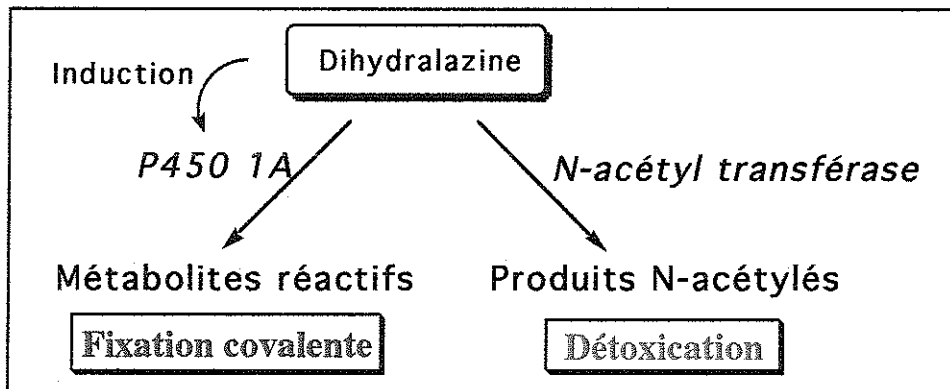


Figure II-12. Métabolisme simplifié de la dihydralazine.

Hépatite induite par l'acide tiénilique

L'acide tiénilique (AT) est un diurétique uricosurique, élaboré par le laboratoire Anphar Rolland et prescrit pour traiter l'hypertension. Son introduction sur les marchés européens et américains remonte à 1976 et 1979 respectivement (Zimmerman *et al.*, 1984). L'acide tiénilique fut cependant rapidement retiré du marché aux États-Unis en 1980 en raison de son potentiel hépatotoxique (Poupon *et al.*, 1980). En effet, les quelques 500 cas d'atteintes hépatiques probablement liées à la prise d'acide tiénilique reportés durant l'année 1980 ont entraîné le retrait rapide du médicament aux États-Unis (Zimmerman *et al.*, 1984). En France, l'arrêt définitif de la prescription d'AT date de 1992 suite à la survenue d'une hépatite fulminante qui a nécessité une transplantation chez un patient traité par le médicament.

Les signes cliniques apparaissent de 1 à 5 mois après le début du traitement à l'acide tiénilique. Le tableau clinique, établi à partir d'observations histologiques réalisées auprès de 27 patients malades, révèle la fréquence élevée des hépatites aiguës (20/27) (Zimmerman *et al.*, 1984). Celles-ci s'accompagnent généralement d'une nécrose centrolobulaire. Une hépatite chronique et/ou une cirrhose s'était établi chez les 7 autres patients malades. Le taux de mortalité chez les patients ictériques est relativement élevé (de l'ordre de 10%). Les patients atteints de l'hépatite liée à la prise d'AT présentent des manifestations immunoallergiques telles que de la fièvre et du rash. De plus, en cas de réintroduction, les symptômes de l'hépatite réapparaissent plus brièvement. Les sera de nombreux patients atteints de l'hépatite à l'AT contiennent des autoanticorps spécifiques qui constituent un marqueur de l'hépatite liée à la

prise d'acide tiénilique (Homberg *et al.*, 1984). Ils sont appelés anti-LKM₂ (anti-liver and kidney microsomes) et ils ne se retrouvent dans aucune autre forme d'hépatite virale ou médicamenteuse (Homberg, 1984; 1985). Ces autoanticorps furent initialement mis en évidence par immunofluorescence sur des coupes de foie et de rein de rat (Homberg *et al.*, 1984). **La cible antigénique humaine des anti-LKM₂ est le CYP2C9** (Beaune *et al.*, 1987 ; Lecoœur *et al.*, 1994). La reconnaissance croisée observée chez le rat s'explique par l'homologie de séquence élevée (76%) entre le CYP2C11, un des P450 majoritaire chez le rat, et le CYP2C9 humain (Pons *et al.*, 1991).

Chez l'homme et le rat, le métabolite majoritaire de l'acide tiénilique est le produit d'hydroxylation sélective en 5 du noyau thiophène (5-OH-AT) (figure II-13) (Mansuy *et al.*, 1984). Deux autres métabolites mineurs sont également formés chez ces deux espèces (Levron *et al.*, 1977 ; Vinay *et al.*, 1980). Le premier, par réduction de la fonction cétone de l'AT et le second, par coupure de la liaison C-C entre les groupes thiophène et cétone .

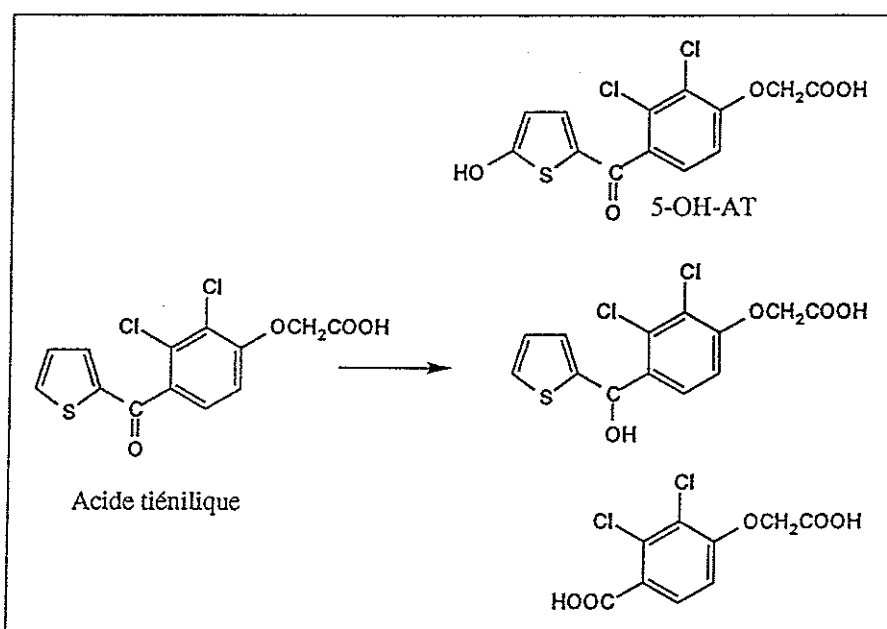


Figure II-13. Principaux métabolites de l'acide tiénilique chez l'homme et le rat.

In vitro, l'oxydation de l'AT par des microsomes de rat ou humains conduit également à la formation majoritaire du 5-OH-AT (Dansette *et al.*, 1990; 1991 ; Neau *et al.*, 1990). L'activation de l'AT génère également des métabolites électrophiles capable de se lier de façon covalente aux protéines. Les anti-LKM₂ inhibent à la fois la formation du 5-OH-AT et celle des métabolites réactifs (Beaune *et al.*, 1987 ; Dansette *et al.*, 1991). Ces résultats indiquent que le CYP2C responsable de l'oxydation de l'AT est la protéine spécifiquement reconnue par les anti-LKM₂ (Lopez-Garcia *et al.*, 1993). De plus, des résultats indirects indiquent que le métabolite électrophile généré lors de l'oxydation de l'AT entraîne une perte de l'activité du CYP2C9 (Lopez-Garcia *et al.*, 1994). En effet, lorsque cette isoforme est exprimée dans un

système hétérologue, l'alkylation du CYP2C9 par l'AT conduit à l'inhibition suicide de l'enzyme. Cette alkylation spécifique du CYP2C9 par l'AT *in vivo* chez l'homme pourrait constituer une étape décisive dans le mécanisme d'apparition des autoAC dirigés contre cette enzyme (Beaune *et al.*, 1987).

II-3-6 Adduits médicament/macromolécule biologique. Techniques d'étude.

Le postulat de base pour expliquer l'apparition des hépatites médicamenteuses à médiation immunitaire consiste à supposer que le médicament alkyle certains constituants cellulaires. La formation de conjugués médicament/constituant cellulaire peut générer de nouveaux épitopes susceptibles de déclencher une réponse immunitaire (Bell *et al.*, 1989 ; Mauri-Hellweg *et al.*, 1995 ; Saoudi *et al.*, 1995 ; Gomez-Lechon *et al.*, 1996). Cette alkylation dépend la plupart du temps d'une activation préalable de la molécule mère en métabolites réactifs. Les AC présents dans les sera de patients atteints d'hépatite médicamenteuse à médiation immunitaire présentent souvent une spécificité importante qui reflète celle de l'alkylation réalisée par le médicament (Kenna *et al.*, 1988 ; Martin *et al.*, 1993 ; Bourdi *et al.*, 1994 ; Pons *et al.*, 1996). Par conséquent, il est important d'identifier le ou les constituants cellulaires qui constituent les cibles d'alkylation des métabolites du médicament afin de mieux cerner l'étiologie de l'hépatite. Deux approches différentes mais toutefois complémentaires permettent d'étudier la formation d'adduits réalisée par un médicament (Pohl, 1993).

L'approche radiochimique permet d'appréhender la structure des métabolites réactifs générés. En outre cette approche autorise également une analyse quantitative et qualitative de la formation d'adduits auxquels ces métabolites participent. Néanmoins, l'utilisation du médicament radiomarqué présente un certain nombre d'inconvénients:

- la synthèse chimique du composé radiomarqué s'avère compliquée dans de nombreux cas,
- le coût élevé du médicament radiomarqué restreint les études *in vivo* chez l'animal,
- la manipulation de molécules radiomarquées introduit de nombreuses contraintes.

L'approche immunochimique autorise la détection spécifique des métabolites du médicament liés aux macromolécules biologiques. La première information fournie par une telle approche est la spécificité de l'alkylation réalisée par le médicament. Certains médicaments alkylent de nombreux constituants cellulaires après leur activation tandis que d'autres présentent une spécificité plus marquée. Ces différences reflètent souvent à la fois le caractère plus ou moins électrophile et la quantité des métabolites réactifs formés. La seconde information accessible ultérieurement consiste en l'identification et la caractérisation des protéines alkylées. Le développement d'AC spécifiquement dirigés contre les adduits du médicament sur les protéines tissulaires nécessite de connaître la structure et la réactivité des métabolites générés. Ces informations sont généralement accessibles par des études métaboliques réalisées *in vitro* avec le médicament radiomarqué. Une fois la structure des adduits déterminée ou prédite, il

Introduction

convient de la reproduire le plus fidèlement possible lors de la préparation de conjugués protéine porteuse-médicament. Ces conjugués serviront alors à immuniser des animaux de façon à obtenir des AC polyclonaux capables de reconnaître la fixation du médicament sur les protéines tissulaires lors de son activation. La figure II-14 présente différents exemples de conjugués immunogènes qui ont servis à obtenir des AC spécifiques afin d'étudier la fixation covalente de médicaments (Pohl, 1993).

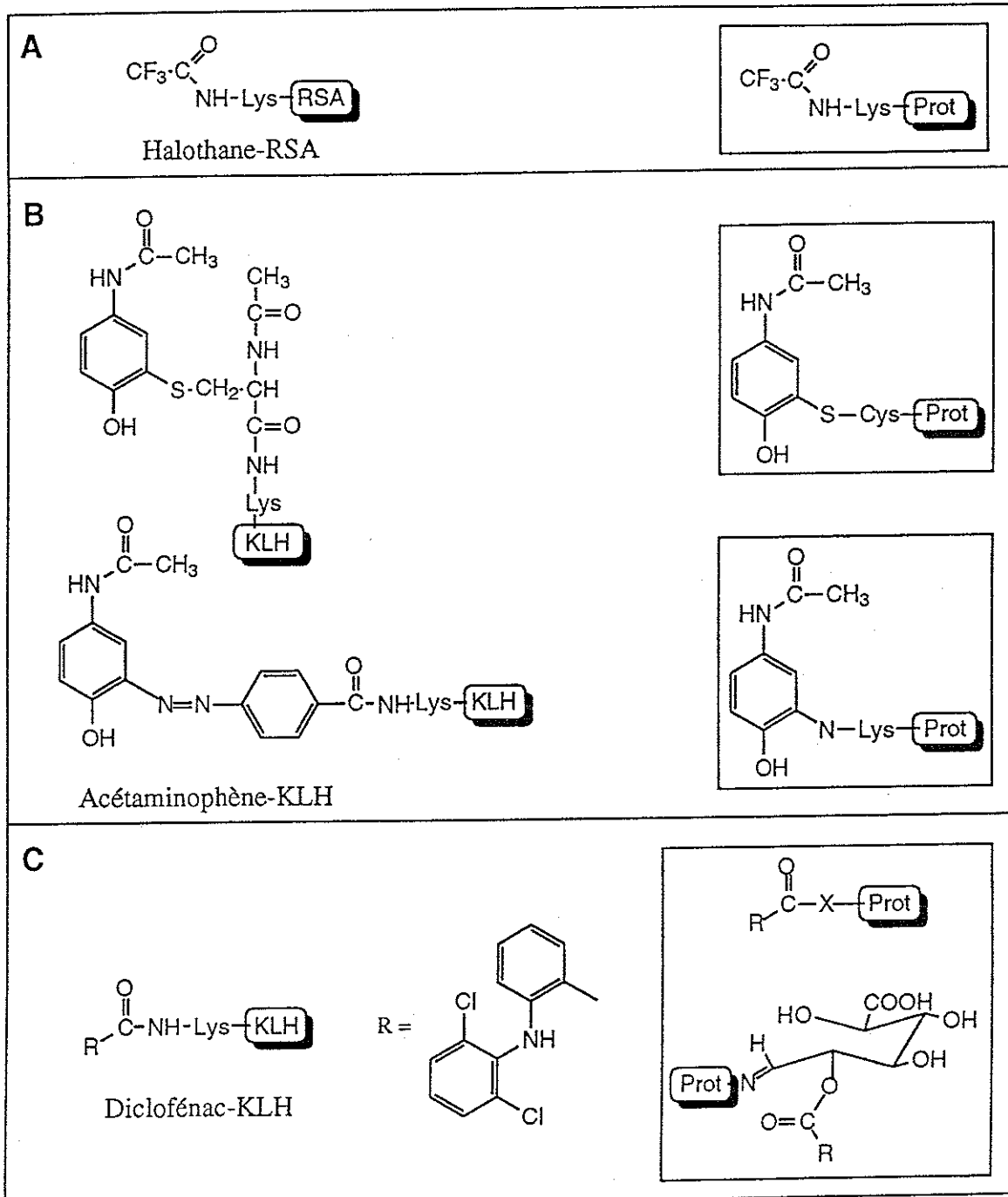


Figure II-14. Conjugués protéine-médicament utilisés pour détecter la fixation covalente de l'halothane (A), de l'acétaminophène (B) ou du diclofénac (C) sur les protéines tissulaires. La structure des adduits formés lors de l'activation métabolique de ces différents médicaments sont encadrés.

III Les motivations du travail

L'hépatite induite par l'acide tiénilique (AT) présente des caractéristiques remarquables dont la principale est l'apparition d'anticorps très spécifiques dans le sera des patients atteints. Ces anticorps, désignés anti-LKM₂, sont dirigés contre le CYP2C9, la protéine responsable de l'activation de l'AT. Les mécanismes qui conduisent à l'apparition de ces anticorps demeurent méconnus. L'ensemble du travail a par conséquent consisté à déterminer les étapes précédant l'apparition des anticorps anti-LKM₂. Nous savions déjà que l'activation de l'AT conduisait à la formation de métabolites réactifs capables de se lier de façon covalente aux protéines microsomales hépatiques. Cependant, jusqu'à présent, aucune étude n'avait permis de mettre en évidence la structure ainsi que la spécificité des adduits générés lors de l'activation de l'AT. Les trois premières parties du travail dont les objectifs sont résumés ci-dessous nous ont permis d'appréhender ces différentes questions. De même, aucune étude n'avait tenté de caractériser une éventuelle influence de la fixation covalente de l'AT sur la réponse immunitaire des patients traités avec ce médicament (présence d'anticorps anti-médicaments dans le serum des patients ?). Nous avons donc abordé cette question dans une quatrième partie citée ci-dessous. Ainsi, l'ensemble de l'étude se décompose en quatre parties dont les objectifs sont les suivants :

Première partie. Déterminer le métabolisme de l'isomère de l'acide tiénilique en position 3 du noyau thiophène (IAT) chez l'homme à l'aide de la technique radiochimique. Les résultats obtenus dans cette première partie nous ont permis d'appréhender la structure probable des adduits formés lors de l'activation de l'AT chez l'homme.

Deuxième partie. Étudier la spécificité de la fixation covalente de l'AT ou de l'IAT sur les protéines hépatiques *in vitro* chez l'homme. Cette étude immunochimique introduit la caractérisation et l'utilisation d'anticorps polyclonaux capables de reconnaître la fixation covalente de l'AT ou de l'IAT sur des protéines.

Troisième partie. Comparer les profils d'alkylation de l'AT *in vitro* sur les protéines microsomales hépatiques de rats préalablement traités ou non par différents inducteurs de P450. Cette troisième partie nous a permis de déterminer quel type de microsomes présentait le profil d'alkylation le plus proche de celui obtenu chez l'homme. Les résultats de cette étude nous ont permis d'étudier la cinétique de la fixation covalente de l'AT sur les protéines hépatiques *in vivo* chez le rat.

Quatrième partie. Rechercher la présence éventuelle d'anticorps dirigés contre le médicament dans le sérum de patients atteints de l'hépatite induite par l'AT.

RÉSULTATS

I Métabolisme de l'isomère de l'acide tiénilique *in vitro* chez l'homme

I-1 Motivations du travail

La majorité des métabolites stables de l'AT formés chez l'homme sont connus (Levron *et al.*, 1977 ; Vinay *et al.*, 1980 ; Mansuy *et al.*, 1984). Il s'agit principalement du produit d'hydroxylation en position 5 du noyau thiophène qui constitue le métabolite majoritaire. Deux autres métabolites sont également formés mais de façon mineure. Le premier, par réduction de la fonction cétone de l'AT et le second, par coupure de la liaison C-C entre le groupe thiophène et la fonction cétone de l'AT. L'activation de l'AT par des microsomes hépatiques humains ou de rat aboutit également à la formation de métabolites électrophiles responsables d'une fixation covalente aux protéines (Dansette *et al.*, 1990; 1991). Cependant, malgré la réalisation de nombreuses études, l'identité ainsi que la structure de ces métabolites réactifs générés lors de l'activation de l'AT restent incertaines. La raison principale de l'inaccessibilité à cette information réside dans le caractère instable de l'entité réactive générée. Ainsi, l'ajout de composés nucléophiles tels que le glutathion, le mercaptoéthanol ou la *N*-acétylcystéine entraîne une diminution de la fixation covalente de l'AT sur les protéines (Lopez-Garcia *et al.*, 1993). Ce résultat met en évidence une possibilité de piégeage des métabolites réactifs de l'AT. Cependant, jusqu'à présent, aucun adduit covalent stable de l'AT n'a pu être isolé.

Le métabolisme de l'isomère de l'acide tiénilique (IAT) qui porte la fonction cétone en position 3 du noyau thiophène, a été déterminé *in vitro* chez le rat par Philippe Valadon (Valadon, 1992). Ce dernier a pu mettre en évidence la formation d'entités électrophiles très réactives susceptibles d'être piégées par des composés nucléophiles de petite taille ajoutés dans le milieu d'incubation (Valadon *et al.*, 1996). En particulier, des adduits d'un sulfoxyde de thiophène sur du mercaptoéthanol ou de la *N*-acétylcystéine ont été isolés lors de cette étude *in vitro*. Ces sulfoxydes de thiophène sont également générés au cours de l'activation de l'IAT *in vivo* chez le rat. Ainsi, Philippe Valadon a pu mettre en évidence des adduits de sulfoxydes de thiophène à la *N*-acétylcystéine dans les urines de rats traités par une dose unique d'IAT. L'entité réactive formée lors du métabolisme oxydatif de l'IAT *in vitro* chez le rat est donc identique à celle trouvée *in vivo*.

Par conséquent, une telle étude *in vitro* réalisée chez l'homme permettrait dans un premier temps de savoir si le métabolisme de l'IAT diffère de celui identifié chez le rat. En particulier, des sulfoxydes de thiophènes sont-ils générés lors de l'activation de l'IAT ? Dans un second temps et de façon plus générale, cette étude permettrait de déterminer si le rat constitue un modèle animal correct pour appréhender les problèmes de toxicité de l'AT observés chez l'homme.

I-2 Recherche d'une S-oxydation microsomale de l'IAT *in vitro* chez l'homme

Le système d'étude retenu se décompose en 5 étapes :

- 1) incubation d'IAT radiomarqué en présence de microsomes hépatiques humains,
- 2) mesure de la fixation covalente de l'IAT sur les protéines microsomales,
- 3) extraction liquide/liquide des métabolites solubles formés,
- 4) séparation de ces métabolites en chromatographie liquide haute pression (CLHP),
- 5) analyse des élugrammes et radiochromatogrammes obtenus.

L'IAT est incubé en présence de microsomes hépatiques SP1 préparés à partir d'un fragment de foie humain unique. Ce fragment provient d'un prélèvement hépatique effectué sur un homme de 53 ans décédé de mort accidentelle. Les caractéristiques des microsomes SP1 sont : un contenu en P450 total de 0.17 nmole/mg de protéines.

Afin de faciliter l'identification des différents métabolites formés lors de l'activation de l'IAT par les microsomes SP1, de l'IAT radiomarqué sur la fonction carboxylique (25 Ci/M) a été utilisé. De plus, l'emploi du composé radioactif permet la mesure de la fixation covalente des métabolites de l'IAT sur les protéines microsomales. En vue de simplifier l'analyse des profils chromatographiques et les spectres RMN, le composé nucléophile utilisé pour piéger des métabolites potentiellement générés est le mercaptoéthanol. Ce dernier a été ajouté aux incubations à différentes concentrations de façon à observer d'éventuelles variations qualitatives et/ou quantitatives de métabolites formés.

I-2-1 Métabolisme de l'IAT en absence de mercaptoéthanol

La figure I-1 (en haut) présente l'élugramme ainsi que le radiochromatogramme d'une incubation analytique d'IAT en présence des microsomes SP1 (P450 total 0.2 μ M, IAT 100 μ M, 20 min. à 37°C, protocole décrit dans la partie expérimentale, p. 132). Entre 6 et 18 minutes, le radiochromatogramme ne permet pas de distinguer de pics de radioactivité spécifiques d'un métabolite. Par contre, au temps de rétention 20 min, un métabolite soluble **I** de l'IAT, présentant un maximum d'absorption UV à 280 nm est identifiable. La présence de **I** dépend de celle du système générateur de NADPH car en absence de ce dernier, le radiochromatogramme ne présente aucun pic de radioactivité hormis celui de l'IAT.

Le métabolisme total de l'IAT (4.8 ± 1 nmole/mg de protéine en 20 minutes) se répartit pour moitié en fixation covalente sur les protéines microsomales (2.4 ± 0.7 nmole/mg de protéine) et en un métabolite soluble unique **I** (2.3 nmole/mg de protéine).

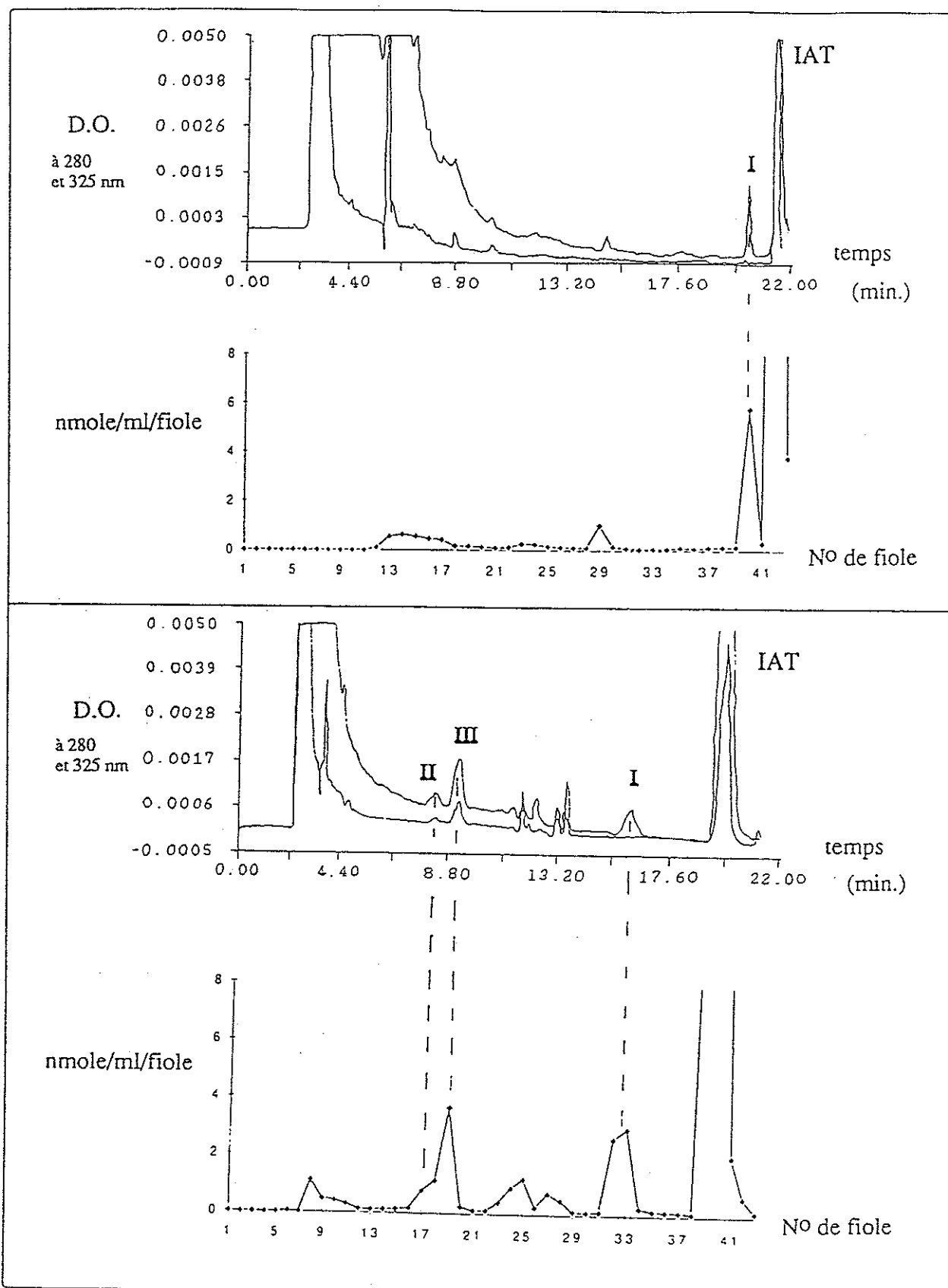


Figure I-1. Incubation analytique d'IAT en présence de microsomes humains sans (en haut) ou avec (en bas) 100 μ M de mercaptoéthanol. Elugrammes avec détection à 280 et 325 nm et radiochromatogrammes correspondants (P450 0.2 μ M, IAT 100 μ M, incubations de 20 min. à 37°C, radioactivité exprimée en nmole/mL/fiole de collection de 30 s.

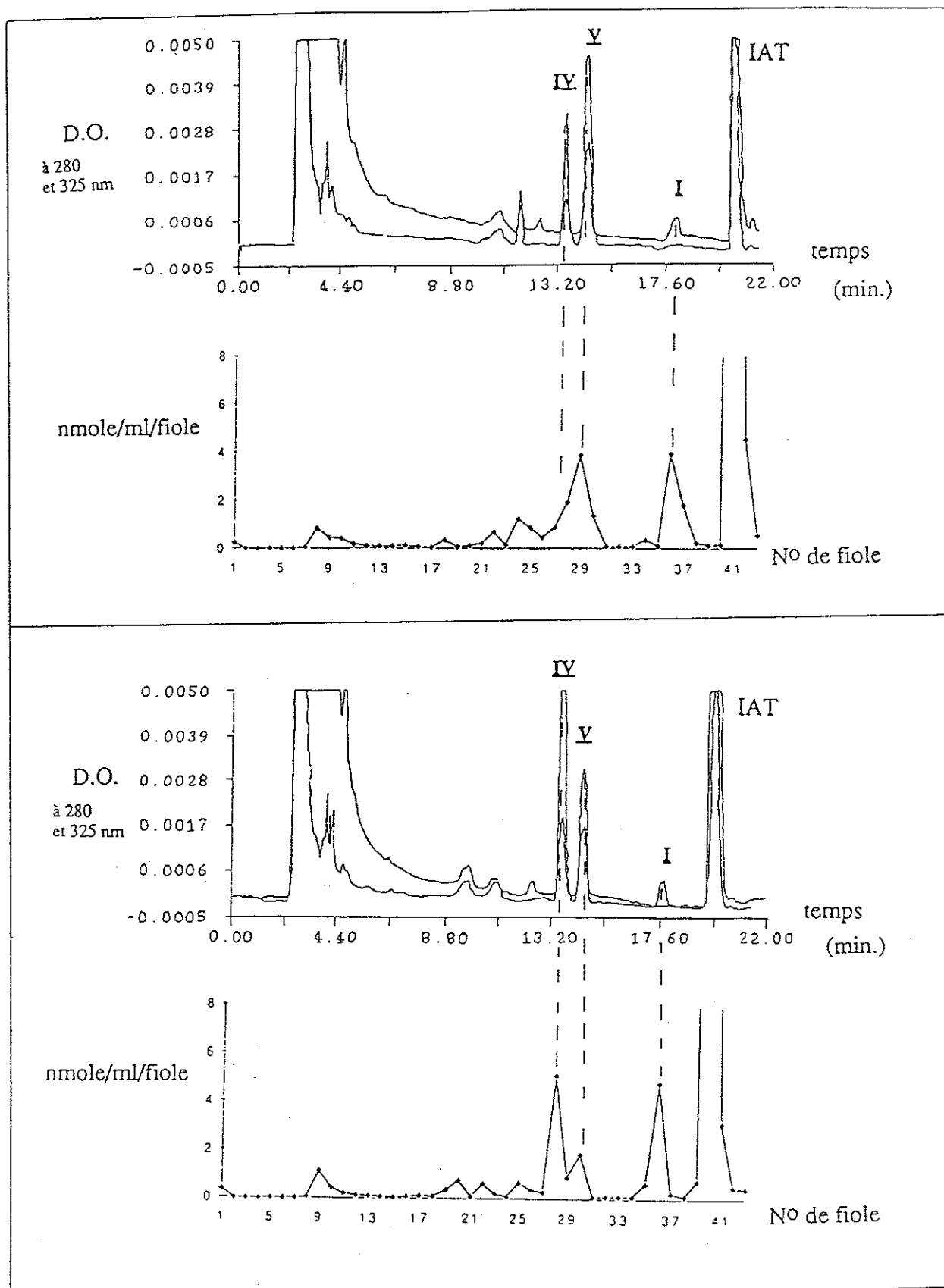


Figure I-2. Incubation analytique d'IAT en présence de microsomes humains et de 1 mM (en haut) ou 5 mM (en bas) de mercaptoéthanol. Éluogrammes avec détection à 280 et 325 nm et radiochromatogrammes correspondants (P450 0.2 μ M, IAT 100 μ M, incubations de 20 min. à 37°C, radioactivité exprimée en nmole/mL/fiole de collection de 30 s.

I-2-2 Métabolisme de l'IAT en présence de mercaptoéthanol

L'IAT est incubé en présence des microsomes SP1 et de différentes concentrations de mercaptoéthanol : 0.1, 1 et 5 mM. Le mercaptoéthanol, par son caractère nucléophile, permet de piéger d'éventuels métabolites électrophiles générés lors de l'activation de l'IAT.

En présence de 0.1 mM de mercaptoéthanol, le radiochromatogramme (figure I-1, en bas) présente plusieurs pics de radioactivité nettement individualisés. Néanmoins, l'élugramme ne permet d'isoler que 3 métabolites solubles de l'IAT. Parmi ces derniers, **I** est identifié par son spectre UV. Les deux autres métabolites notés **II** et **III** suivant leur ordre d'apparition possèdent une polarité plus importante que **I** et présentent par conséquent des temps de rétention plus courts (8.5 et 9 minutes respectivement). La valeur du métabolisme total de l'IAT est similaire à celle déterminée en absence de mercaptoéthanol (voir tableau I-1, p. 57). Par contre, sa répartition diffère : la fixation covalente de l'IAT sur les protéines chute de près de 80% par rapport à celle déterminée en absence de mercaptoéthanol. Cette baisse de la fixation covalente correspond à l'apparition de **II** et **III**. De ces deux métabolites, **III** est majoritaire d'environ un facteur 4. La quantification de la radioactivité associée à **I** montre que sa formation contribue encore à 50% du métabolisme total.

En présence de 1 mM de mercaptoéthanol, l'élugramme (figure I-2, en haut) permet d'identifier deux nouveaux métabolites **IV** et **V** qui possèdent une polarité intermédiaire à celle de **I** et de celles des deux précédents métabolites **II** et **III**. Ainsi, **IV** et **V** sortent respectivement aux temps 13.3 et 14.4 minutes dans les conditions de l'analyse. Contrairement à **I**, les métabolites **II** et **III** ne sont pas présents pour cette concentration de mercaptoéthanol. La valeur du métabolisme total ainsi que la contribution du métabolite **I** à ce dernier restent globalement constantes (voir tableau I-1). L'ajout de 1 mM de mercaptoéthanol se traduit par une nouvelle baisse de la fixation covalente des métabolites de l'IAT sur les protéines microsomales. Cette diminution est corrélée avec l'apparition de **IV** et **V**. De ces deux métabolites, **V** est prépondérant d'un facteur 2 environ.

En présence de 5 mM de mercaptoéthanol, les profils de l'élugramme et du chromatogramme ressemblent à ceux obtenus pour 1 mM de mercaptoéthanol (figure I-2, en bas). En effet, les métabolites de l'IAT identifiés sont les mêmes, à savoir **I**, **IV** et **V**. La contribution globale de **IV** + **V** au métabolisme total demeure inchangée. Néanmoins, le radiochromatogramme montre qu'en présence de 5 mM de mercaptoéthanol, **IV** représente le métabolite majoritaire. La fixation covalente aux protéines diminue encore de moitié par rapport à celle déterminée en présence de 1 mM de mercaptoéthanol. La contribution de **I** au métabolisme total reste équivalente à celle déterminée pour les deux concentrations de mercaptoéthanol précédentes.

Tableau I-1. Répartition* du métabolisme total de l'IAT entre la fixation covalente aux protéines microsomales et les métabolites solubles en fonction de la concentration en mercaptoéthanol employée dans l'incubation (microsomes humains 0.2 μ M en P450, 100 μ M IAT, 1 mM NADPH, incubations 20 minutes à 37°C).

Concentration en 0 mercaptoéthanol	0.1 mM	1 mM	5 mM	
Fixation covalente	2.4 \pm 0.7	0.5	0.2	0.12
I	2.4 \pm 0.3	2.3	2.4	2 \pm 0.2
II	n.d.	0.45	n.d.	n.d.
III	n.d.	1.9	n.d.	n.d.
IV	n.d.	n.d.	1.2	2.3
V	n.d.	n.d.	2.2	0.5
IV + V	n.d.	n.d.	3.4	3.3 \pm 0.4
Métabolisme total	4.8 \pm 1	5.1	6	5.4 \pm 0.6

* Toutes les valeurs sont exprimées en nmole/mg de protéines (\pm déviation standard si n > 2).
n.d. non détecté.

A l'exception de **I**, l'apparition des métabolites de l'IAT dépend de la présence de mercaptoéthanol dans le milieu d'incubation. L'ajout de cet agent nucléophile puissant se traduit également par une diminution concomitante de la fixation covalente de l'IAT sur les protéines microsomales. Ces deux résultats indiquent clairement que les métabolites **II**, **III**, **IV** et **V** sont des adduits de piégeage de métabolites électrophiles de l'IAT par le mercaptoéthanol. La concentration de ces quatre métabolites dépend de celle du mercaptoéthanol. Ainsi, pour une faible concentration de ce dernier, les métabolites **II** et **III** apparaissent dans un rapport 20/80. L'ajout d'une quantité de mercaptoéthanol plus importante dans l'incubation se traduit par la disparition de **II** et **III** au profit de deux nouveaux métabolites **IV** et **V**. Les proportions relatives de **IV** et **V** évoluent en fonction de l'augmentation de la concentration en mercaptoéthanol.

I-3 Détermination de la structure des quatre produits de piégeage par le mercaptoéthanol

Le tableau I-2 présente les temps de rétention ainsi que les caractéristiques d'absorption UV des métabolites II, III, IV et V.

Tableau I-2. Temps de rétention et caractéristiques d'absorption UV des métabolites II, III, IV et V en solution aqueuse à pH 7.4.

Métabolite	Temps de rétention (min)	λ max (nm)	ϵ max ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$)
<u>II</u>	8.5	287	7200
<u>III</u>	9.0	292	6400
<u>IV</u>	13.3	334	22 000
<u>V</u>	14.4	317	20 800

Nous avons comparé les temps de rétention en CLHP et les caractéristiques spectrales de ces quatre métabolites avec ceux obtenus précédemment par Philippe Valadon (Valadon, 1992) dans son étude du métabolisme de l'IAT *in vitro* chez le rat.

Les métabolites II et III trouvés *in vitro* chez l'homme correspondent à deux métabolites polaires obtenus lors d'incubations d'IAT en présence de microsomes hépatiques de rat. Ces deux métabolites n'étaient décelables dans le milieu réactionnel qu'avec des concentrations de mercaptoéthanol inférieures à 0.5 mM. Leur analyse par RMN du proton ainsi que par spectrométrie de masse avait montré qu'il s'agissait de deux diastéréoisomères de l'adduit de piégeage d'un sulfoxyde de thiophène par le mercaptoéthanol (figure I-3). La formation d'un sulfoxyde entraîne en effet l'apparition d'un soufre chiral au sein de la molécule. Le fait que II et III soient des stéréoisomères explique les similitudes de leurs temps de rétention et de leurs caractéristiques spectrales.

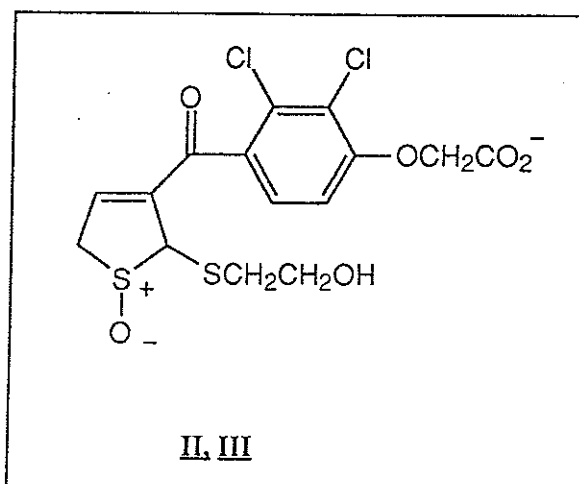


Figure I-3. Structure des métabolites II et III.

Résultats

Un suivi de **II** et **III** purifiés par CLHP et incubés en présence de diverses concentrations de mercaptoéthanol à différents pH avait montré que ces métabolites sont instables. En effet, entre pH 7.4 et 12, **II** et **III** se transforment spontanément en deux autres métabolites dont les proportions relatives dépendent de la concentration de mercaptoéthanol. Ce processus de transformation séquentiel de **II** et **III** en deux autres métabolites se retrouve quand de l'IAT est incubé en présence de microsomes de rat et de concentrations de mercaptoéthanol au moins égales à 0.2 mM (Valadon *et al.*, 1996). Les temps de rétention ainsi que les caractéristiques spectrales de **IV** et **V** obtenus *in vitro* chez l'homme sont identiques à ceux de ces métabolites. Ainsi, les métabolites **IV** et **V** dérivent de la transformation de **II** ou **III** en présence de concentrations croissantes de mercaptoéthanol. La structure des métabolites isolés chez le rat et correspondant à **IV** et **V** chez l'homme a été déterminée par spectrométrie de masse et RMN du proton. Ainsi, **V** correspond au produit d'addition de 2 molécules de mercaptoéthanol supplémentaires sur le cycle thiophène de **II** ou **III** (figure I-4). Le métabolite **IV** dérive de la réduction de **V** par un excès de mercaptoéthanol. Ceci explique que la concentration de **V** diminue au profit de celle de **IV** quand la quantité de mercaptoéthanol augmente dans les incubations.

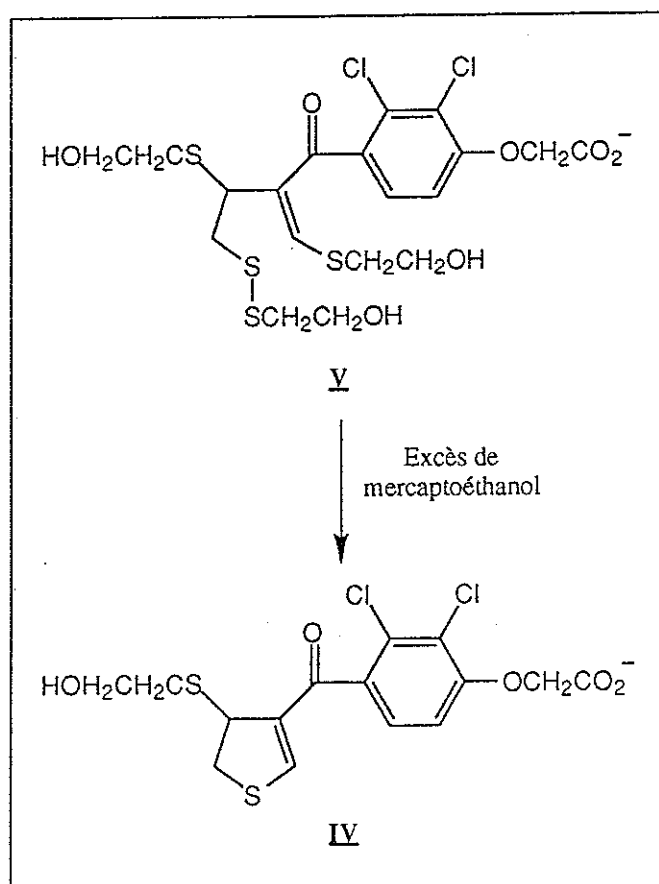


Figure I-4. Structure des métabolites **IV** et **V**.

I-4 Détermination de la structure du métabolite I

L'apparition du métabolite I est indépendante de la présence de mercaptoéthanol dans le milieu. Il ne s'agit donc pas d'un produit de piégeage. Néanmoins, sa contribution au métabolisme total de l'IAT est importante et justifie la détermination de sa structure. Il s'agit d'un métabolite relativement apolaire comme le montre son temps de rétention élevé (de l'ordre de 18 minutes). Le maximum d'absorption de I situé à 280 nm laisse supposer que ce métabolite provient d'une réduction de la fonction cétone de l'IAT. Un argument en faveur de cette hypothèse réside en l'existence d'une telle réduction de la fonction cétone de l'acide thiénique chez l'homme et le chien (Levron *et al.*, 1977 ; Vinay *et al.*, 1980). Cette réduction de l'AT représente alors respectivement 11 et 80% des métabolites retrouvés dans les urines.

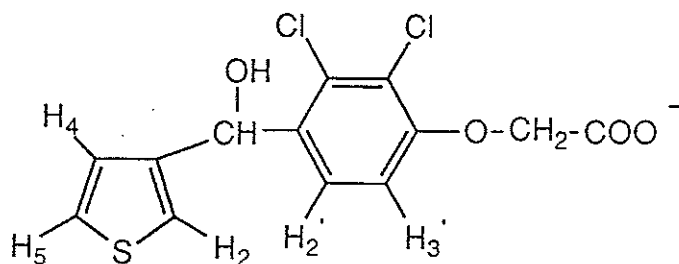
Afin de confirmer l'hypothèse d'une réduction de la fonction cétone de l'IAT, nous avons comparé les caractéristiques physico-chimique du métabolite I et d'un authentique de l'IAT réduit sur sa fonction cétone par NaBH₄, 1. Ainsi, la RMN ¹H (tableau I-3 et figure I-5) et les spectres de masse (figure I-6), et de 1 et de I correspondent en tous points.

Tableau I-3. Tables RMN ¹H d'un authentique 1 issu de la réduction de la fonction cétone de l'IAT et du métabolite I.

	H ₂	H ₄	H ₅	H-COH	H ₂ '	H ₃ '	O-CH ₂ *
métabolite I	7.22 dd 1.5-3 1H	6.96 dd 1.5-5 1H	7.40 dd 3-5 1H	5.96 s 1H	7.42 d 9 1H	6.83 d 9 1H	4.23 s 2H
<u>1</u>	7.21	6.96	7.40	5.98	7.41	6.81	4.16

δ en ppm/Si(CH₃)₄, J en Hz, s=singulet, d=doublet, dd=doublet de doublet

* blindage des protons du groupe OCH₂ dans le cas de 1 par rapport au métabolite I du fait de la différence d'ionisation de la fonction carboxylique des deux molécules.



1

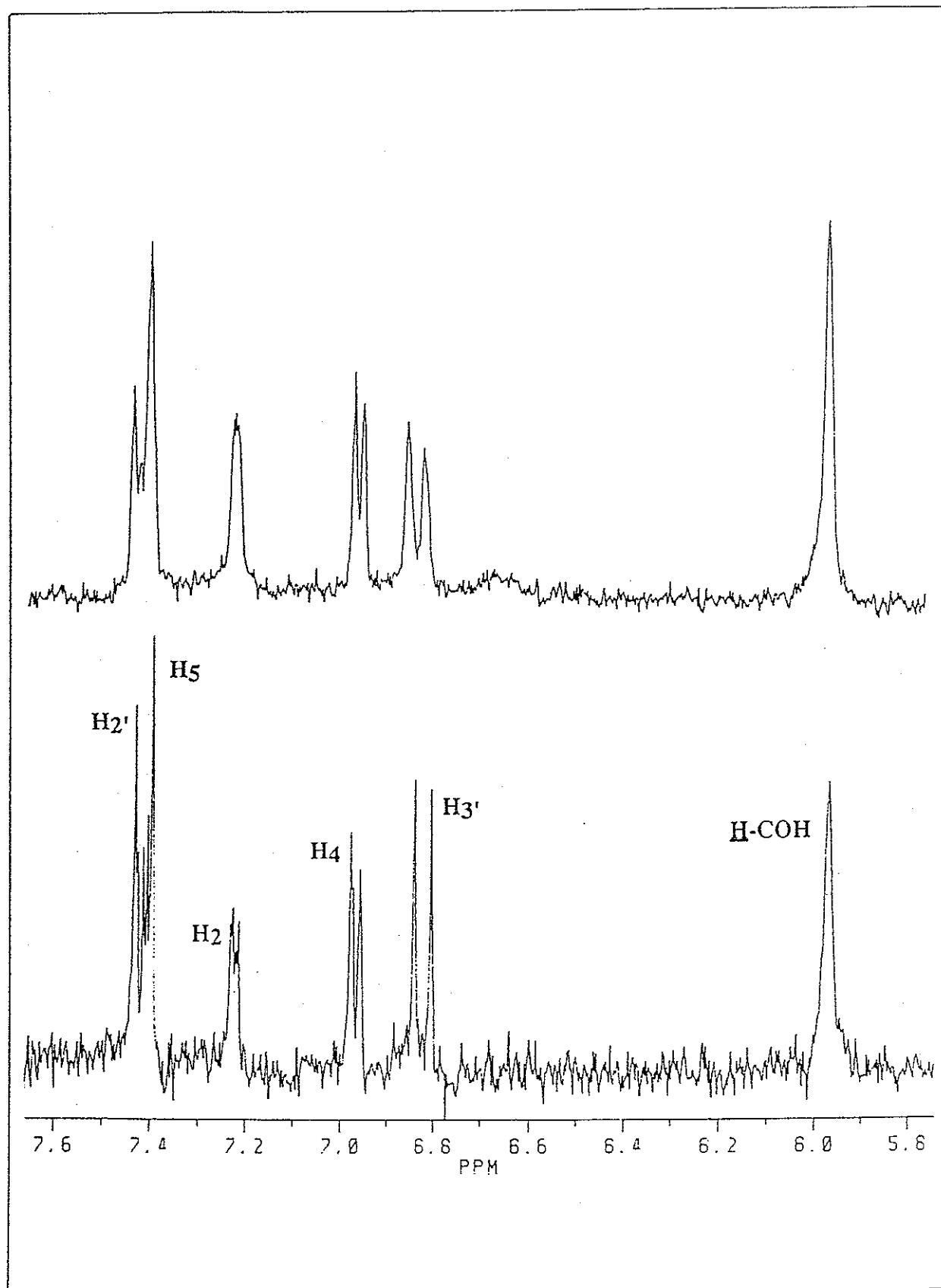


Figure I-5. Spectres RMN ^1H du métabolite I (en haut) et de l'authentique IAT réduit sur la fonction cétone I (en bas) dans le DMSO-D₆ (250 Mhz).

Résultats

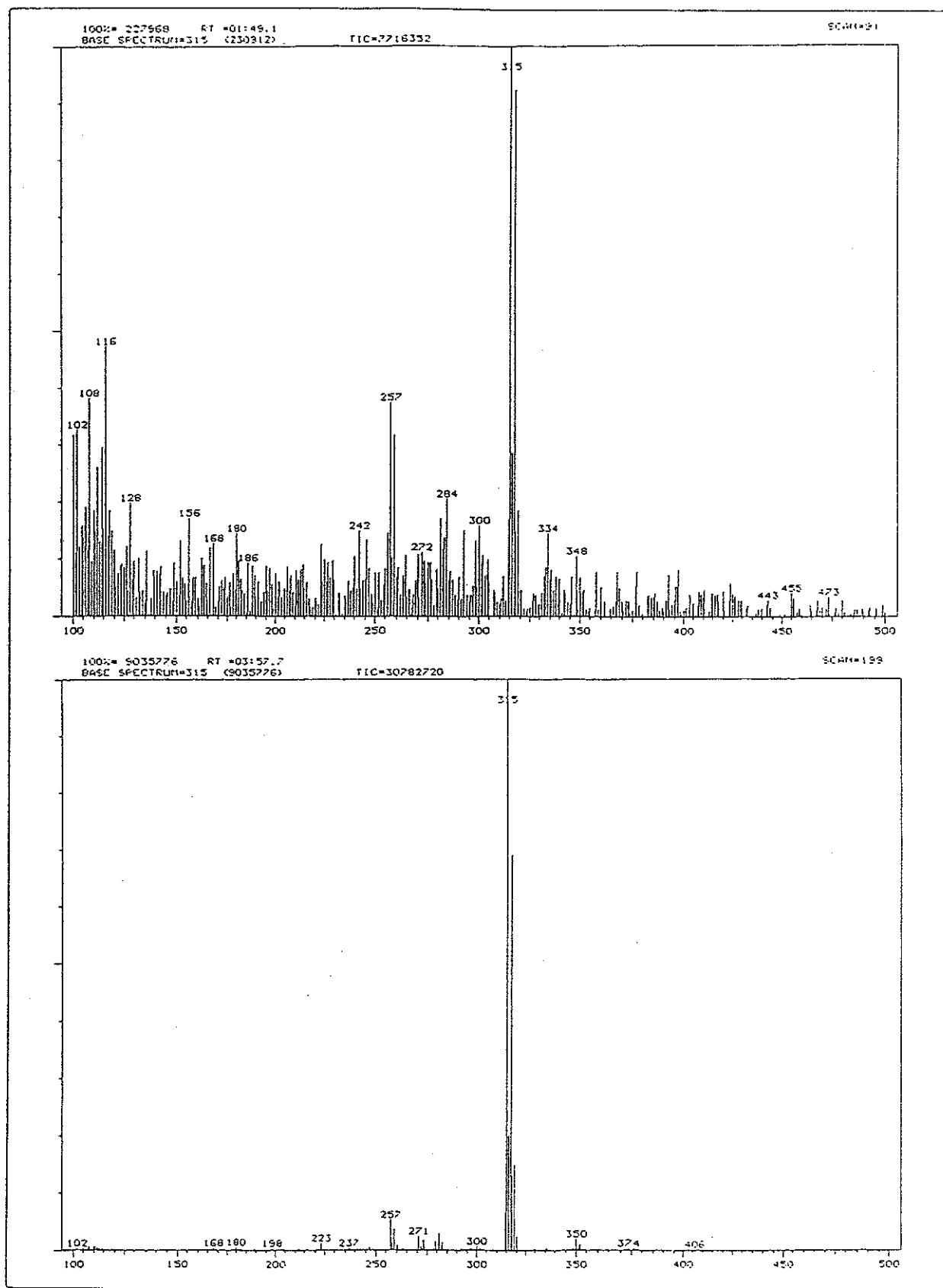


Figure I-6. Spectres de masse du métabolite I (en haut) et de l'authentique IAT réduit sur la fonction cétone I (en bas).

I-5 Influence des anti-LKM2 sur la formation des métabolites de l'IAT

L'influence des anticorps anti-LKM2 (présents dans les sera de patients atteints d'une hépatite liée à la prise d'AT) sur l'apparition des métabolites de l'IAT a été étudiée. Dans ce but, les microsomes SP1 sont préincubés pendant 20 minutes à 0°C avec des sera contenant des anticorps anti-LKM2 (KUT, JOR) ou avec un serum témoin (prélevé sur une personne non traitée à l'AT). Les incubations d'IAT en présence de ces microsomes se déroulent ensuite de façon classique. La figure I-7 présente les pourcentages d'inhibition de la S-oxydation (métabolites **IV** et **V**) et de la réduction (métabolite **I**) de l'IAT par ces différents sera.

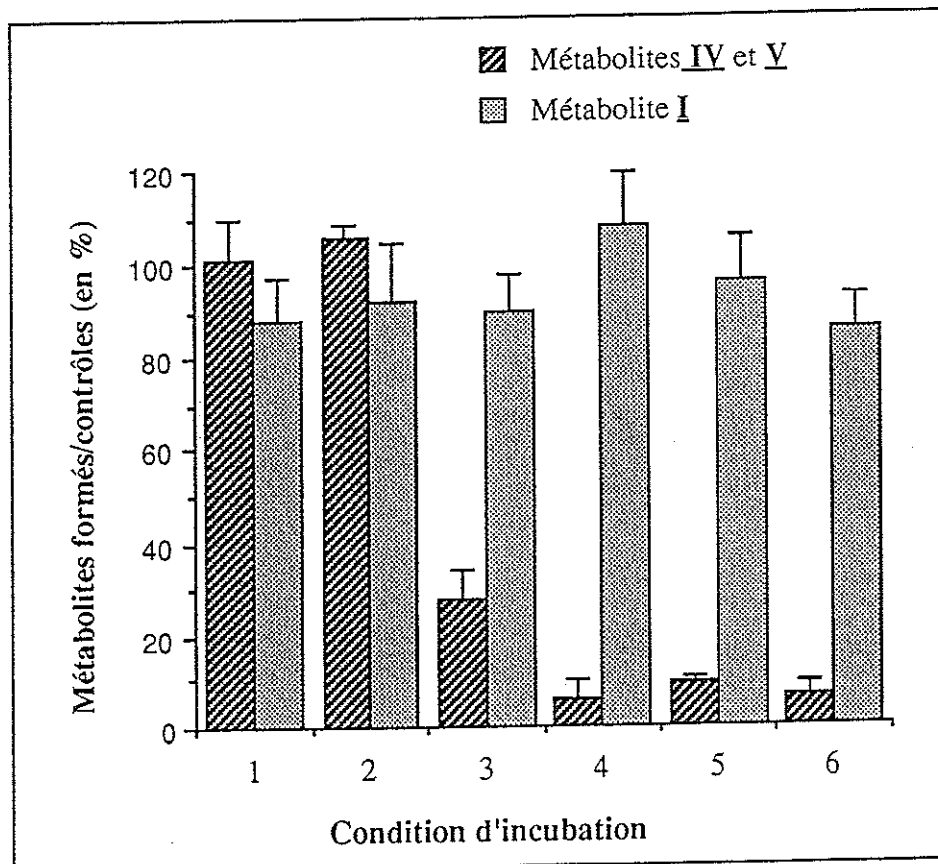


Figure I-7. Influence de la préincubation de microsomes humains avec différents sera sur la formation des métabolites **I**, **IV** et **V** (P450 0.2 μ M, IAT 100 μ M, mercaptoéthanol 5 mM, 20 min. à 37°C). Préincubation 20 minutes à 0°C avec les différents sera. 1: serum témoin 20 μ L/nmole P450; 2: serum témoin 50 μ L/nmole P450; 3: serum KUT 20 μ L/nmole P450; 4: serum KUT 50 μ L/nmole P450; 5: serum JOR 20 μ L/nmole P450; 6: serum JOR 50 μ L/nmole P450. Les sera KUT et JOR contiennent des anti-LKM2 qui inhibent l'activité des P450 de la sous-famille 2C. Les incubations contrôles utilisent des microsomes non préincubés. Les pourcentages représentent les valeurs moyennes de 3 incubations \pm la déviation standard.

La *S*-oxydation de l'IAT est déterminée par l'utilisation d'une concentration de 5 mM en mercaptoéthanol qui permet de suivre les métabolites de piégeage **IV** et **V**. La réduction de l'IAT est suivie par dosage de **I**. La quantification de ces différents métabolites s'effectue par détermination de la radioactivité associée à leurs pics respectifs. La valeur de référence est calculée en absence de sérum. La formation des métabolites **IV** et **V** est fortement inhibée par la préincubation des microsomes humains avec les sera qui contiennent des anti-LKM₂ (KUT et JOR). L'origine de cette inhibition réside effectivement dans la présence des anticorps anti-LKM₂ car la préincubation des microsomes avec le serum témoin n'a aucun effet sur les métabolites **IV** et **V**. Comme les anticorps anti-LKM₂ sont spécifiquement dirigés contre le CYP2C9 (Lecoeur *et al.*, 1996), ce résultat montre que la *S*-oxydation de l'IAT est sous la dépendance de cette isoforme *in vitro* chez l'homme. A l'opposé, la réduction de l'IAT (formation du métabolite **I**) est insensible à la présence des différents sera. Cette activité n'est donc pas CYP2C9 dépendante.

I-6 Influence de différentes conditions d'incubation sur la formation des métabolites de l'IAT

Afin de définir l'origine de la réduction de l'IAT, nous avons fait subir différents traitements aux microsomes et nous nous sommes placés dans des conditions d'inhibition de diverses enzymes microsomales. Les résultats de cette étude sont rassemblés sur la figure I-8. La réduction de l'IAT est catalysée par des enzymes comme le montre la perte de cette activité lorsque les microsomes sont bouillis pendant 5 minutes. Les enzymes impliquées ne sont pas les flavines monooxygénases car leur dénaturation thermique par chauffage à 45°C n'inhibe pas la formation du métabolite **I**. La réduction de l'IAT est NADPH dépendante car la suppression du système générant ce dernier ou son remplacement par le NADH aboutit à une inhibition importante (99% dans le cas de la suppression du système générateur de NADPH et 88% quand NADH est le seul cofacteur apporté). Par contre, l'apport de NADH à la concentration de 7.10^{-4} M en plus du système générateur de NADPH, permet d'augmenter la formation de **I** de 16% en moyenne par rapport au témoin. Aucun des métabolites de l'IAT n'est inhibé par 10^{-4} et 10^{-3} M de SKF 525, un inhibiteur classique des cytochromes P450. L'AT, incubé à la même concentration que son isomère (100 μ M), permet d'inhiber la formation de **IV** et de **V** de 64% sans que celle de **I** ne soit affectée. Cette donnée confirme le fait que l'AT et son isomère sont pris en charge par le même P450, ce qui aboutit à ce phénomène de compétition. La métyrapone, un autre inhibiteur de cytochromes P450, à 10^{-4} M inhibe de 37% la réduction de l'IAT mais est sans action sur la formation des autres métabolites.

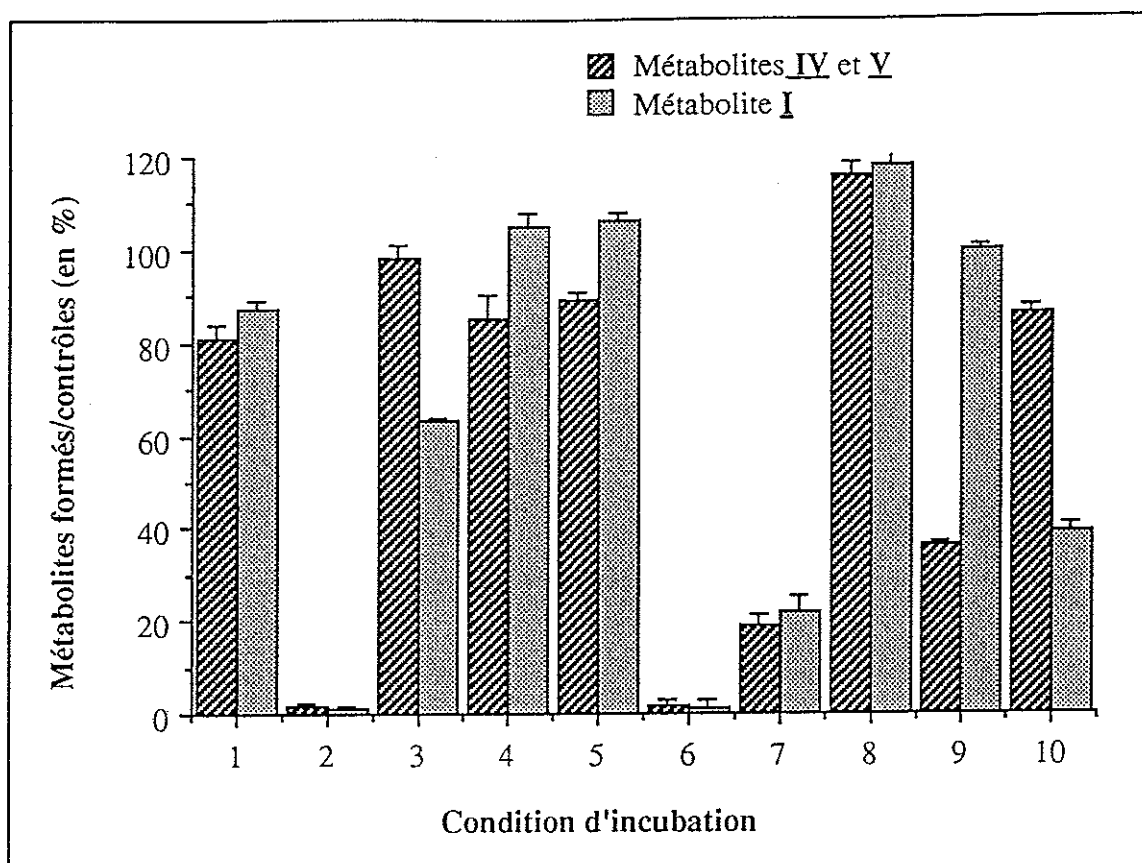


Figure I-8. Influence de différentes conditions incubation sur la formation des métabolites I, IV et V par les microsomes humains (P450 0.2 μ M, IAT 100 μ M, mercaptoéthanol 5 mM, 20 min., 37°C). 1: microsomes chauffés 5 min. à 45°C; 2: microsomes bouillis 5 min; 3: + métyrapone 100 μ M; 4: + SKF 525A 100 μ M; 5: + SKF 525A 1 mM; 6: - NADPH; 7: - NADPH, + NADH 7.10⁻⁴ M; 8: + NADH 7.10⁻⁴ M; 9: + acide tiénilique 100 μ M; 10: + 5 α dihydrotestostérone 100 μ M. Les pourcentages représentent les valeurs moyennes de trois incubations \pm la déviation standard.

D'après la littérature (Maser *et al.*, 1991), la fonction cétone de la métyrapone peut être réduite par une hydrostéroïde deshydrogénase, une enzyme microsomale dont le substrat naturel est la 5 α dihydrotestostérone (5 α DHT) (figure I-9). L'apport de 100 μ M de 5 α DHT au milieu réactionnel inhibe la formation de I de plus de 60% alors que les quantités de IV et de V ne sont pas modifiées. La réduction microsomale de l'IAT semble par conséquent être sous la dépendance de cette hydrostéroïde deshydrogénase. La réduction cytosolique de l'IAT n'a pas été étudiée.

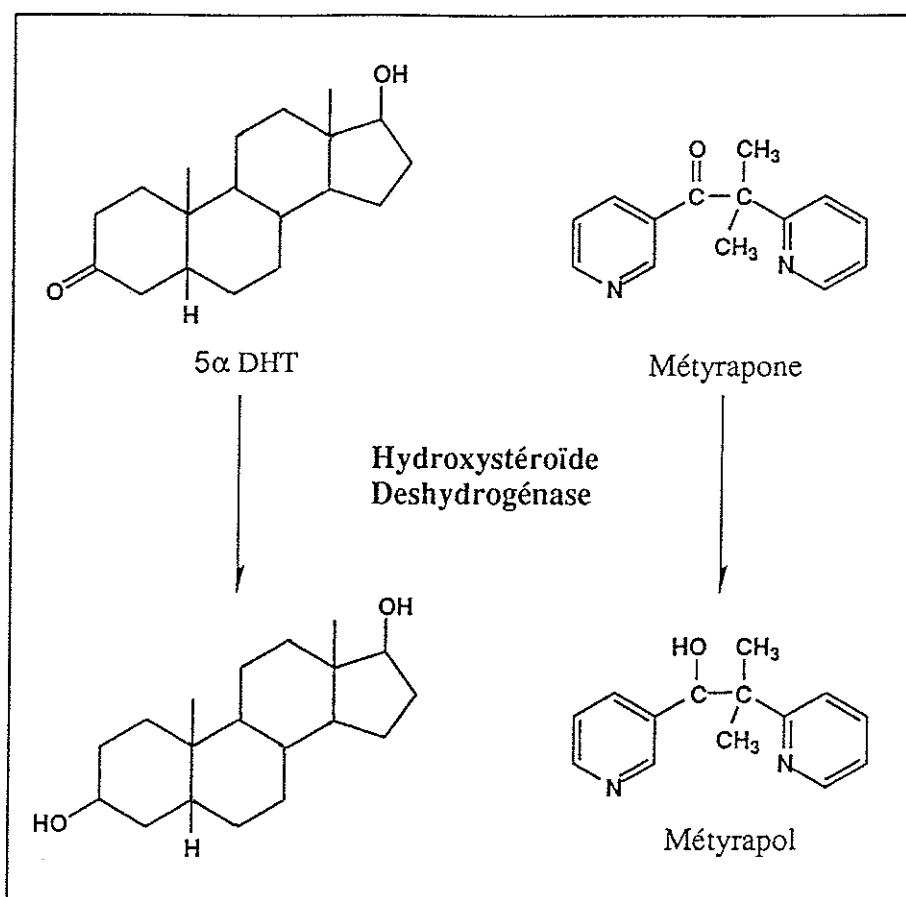


Figure I-9. Réduction de la fonction cétone de la métyrapone et de la 5 α DHT par une hydrostéroïde deshydrogénase.

I-7 Conclusion

Le métabolisme hépatique de l'IAT *in vitro* chez l'homme se décompose en deux voies distinctes: **une voie réductrice** qui aboutit à la réduction de la fonction cétone du composé en alcool. **une voie oxydative** qui constitue la voie d'activation de l'IAT avec formation d'espèces réactives. Chacune de ces deux voies contribuent de façon égale au métabolisme total de l'IAT avec le lot de microsome humain testé.

La réduction de la fonction cétone de l'IAT n'est pas sous la dépendance du CYP2C9. En effet les AC anti-LKM₂ n'inhibent pas cette activité. De même, l'inhibition des cytochromes P450 par des composés à spectre large comme le SKF525A ou l'inactivation thermique des flavines monooxygénases ne permet pas de diminuer la formation d'IAT réduit. Cependant, la métyrapone, un autre inhibiteur classique de cytochromes P450, entraîne une baisse significative de la formation du métabolite réduit. La fonction cétone de la métyrapone subit également une réduction catalysée par une hydrostéroïde deshydrogénase microsomale dont le substrat naturel est la 5 α dihydrotestostérone (5 α DHT) (Maser *et al.*, 1991). La 5 α DHT inhibe de façon importante la réduction de la fonction cétone de l'IAT. Il semble donc probable que la réduction de l'IAT dépende de cette hydrostéroïde deshydrogénase microsomale.

Résultats

Les métabolites réactifs formés durant l'activation de l'IAT sont responsables d'une fixation covalente importante sur les protéines microsomales. Cette formation de métabolites réactifs est inhibée par les anticorps anti-LKM2 contenus dans les séras de patients atteints de l'hépatite liée à la prise d'AT. Ces AC sont spécifiques du CYP2C9 et inhibent les réactions que ce P450 catalyse. Par conséquent, la voie oxydative responsable de la formation des espèces réactives à partir de l'IAT est sous la dépendance du CYP2C9 chez l'homme. Au cours de cette étude, les métabolites réactifs formés par le CYP2C9 ont pu être piégés par le mercaptoéthanol. Il s'agit de sulfoxydes de thiophène. En faisant varier la concentration de mercaptoéthanol ajoutée dans l'incubation, différents métabolites de piégeage ont pu être identifiés. Ces derniers sont identiques à ceux déterminés précédemment *in vitro* chez le rat, ce qui fait de cet animal un bon modèle d'étude de la toxicité de l'IAT et de l'AT chez l'homme. La figure I-10 résume la séquence de transformations qui à partir de l'IAT et de mercaptoéthanol permettent d'obtenir ces différents adduits de piégeage identifiés à la fois chez l'homme et chez le rat. Malgré le fait qu'aucun adduit de piégeage n'ait pu être isolé dans le cas de l'AT, il est probable que sa fixation covalente dépende également d'une formation de sulfoxydes de thiophènes. Les arguments en faveur de cette hypothèse proviennent de la similitude entre les structures des deux composés ainsi que de l'inhibition de la fixation covalente de l'AT et de l'IAT par les anti-LKM2.

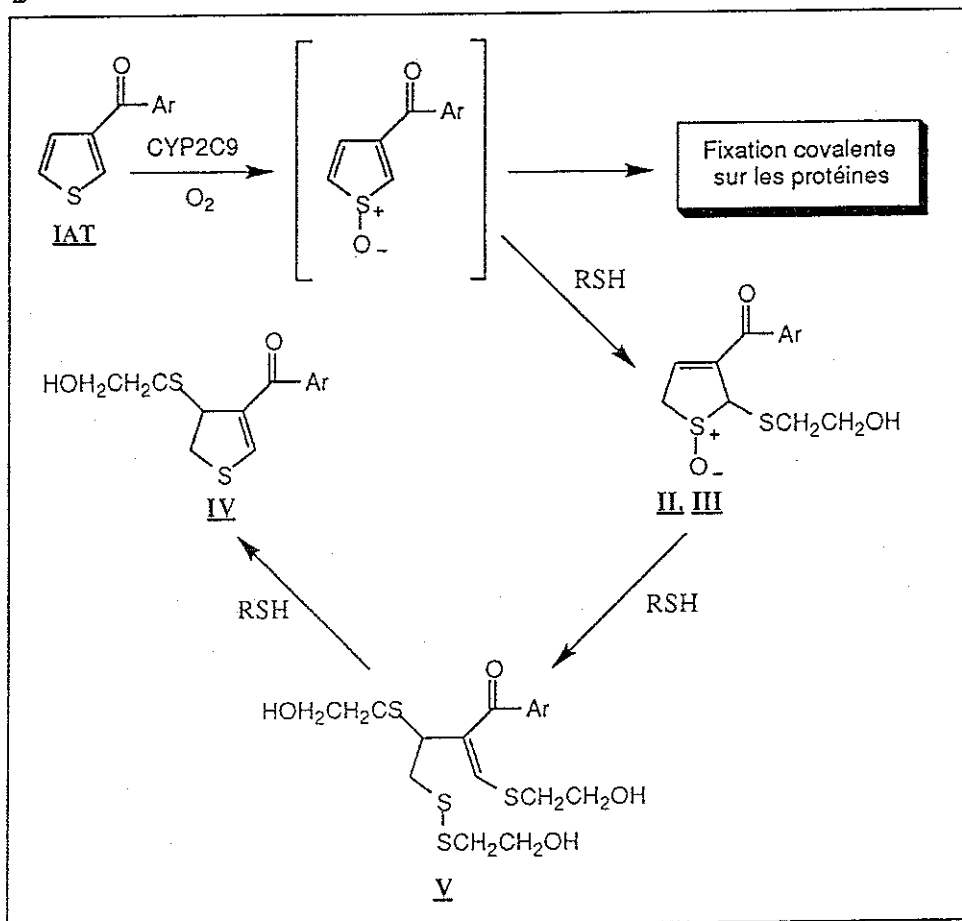


Figure I-10. Métabolisme oxydatif de l'IAT *in vitro* chez l'homme et le rat en présence de mercaptoéthanol (RSH).

II Étude de la fixation covalente de l'AT et de l'IAT sur les protéines microsomales hépatiques chez l'homme

II-1 Motivations du travail

L'AT, comme son isomère, se fixe de façon covalente sur les protéines microsomales hépatiques. Cette formation d'adduits, détectée chez l'homme et le rat, est quantifiée par comptage de la radioactivité associée aux protéines après métabolisation de l'un ou l'autre des deux composés radiomarqués (Dansette *et al.*, 1991). Cependant cette approche radiochimique ne fournit aucun détail en ce qui concerne la spécificité des adduits formés. Afin de mieux cerner l'étiologie de l'hépatite liée à la prise d'AT, il est intéressant de pouvoir déterminer les caractéristiques de la fixation covalente de l'AT. En particulier, existe-t'il une ou plusieurs protéines spécifiquement alkylées par l'AT ? Qu'elle est leur nature ? Possèdent-elles un rôle particulier dans le métabolisme du médicament ? Le profil d'alkylation de l'AT permet-il de mieux comprendre l'apparition des anticorps anti-LKM₂ ? Les profils d'alkylation de l'AT et de son isomère sont-ils similaires ou au contraire différents ? Afin de répondre à ces différentes questions, nous avons utilisé une approche immunochimique. Cette technique s'est avérée particulièrement utile pour appréhender certaines hépatites immunoallergiques consécutives à la prise de médicaments (Pohl, 1993). En particulier, certains adduits détectés lors de ces études sont probablement impliqués dans les processus conduisant à la survenue de l'hépatite. Ainsi, dans le cas de l'halothane, un dérivé trifluoroacétyl très réactif est généré. Ce dernier se fixe de façon covalente sur les résidus lysines de protéines hépatiques (Kenna *et al.*, 1988). Des anticorps capables de reconnaître cette fixation covalente ont été obtenus par diverses équipes après immunisation d'animaux par un conjugué halothane-protéine porteuse (Kenna *et al.*, 1990 ; Christen *et al.*, 1991 ; Martin *et al.*, 1991). Ces équipes ont ainsi pu déterminer la nature des protéines alkylées par les métabolites réactifs de l'halothane. Des anticorps spécifiquement dirigés contre ces mêmes protéines, alkylées ou non, étaient également présents dans les séras de patients atteints de l'hépatite sévère à l'halothane. Ces résultats démontrent ainsi le rôle de ces conjugués dans l'apparition des troubles immunoallergiques liés à la prise d'halothane.

Résultats

Dans le cas de l'AT, deux stratégies de couplage de l'AT à différentes protéines porteuses ont été successivement mises au point au laboratoire. La première, développée par Catherine Pons (Pons, 1989), mettait en jeu l'extrémité carboxylique de l'AT. Le conjugué synthétisé sera ultérieurement désigné SAB-N-AT en raison de la liaison amide formée qui lie la protéine à l'AT (figure II-1).

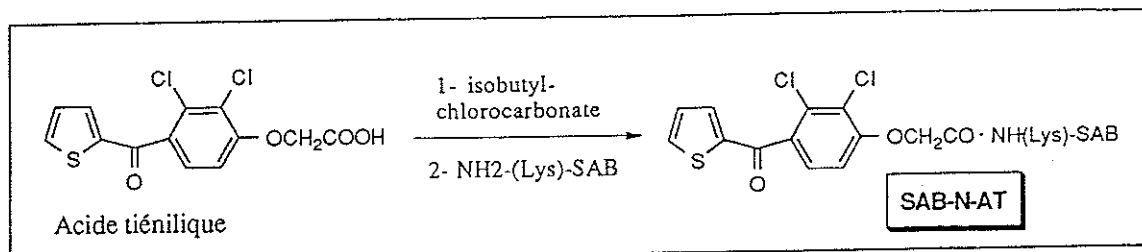


Figure II-1. Principe du couplage de l'AT à la SAB par sa fonction carboxyle (Pons, 1989).

La seconde, développée plus tard par Philippe Valadon (Valadon, 1992), prenait en compte les données récentes obtenues sur le métabolisme de l'IAT chez le rat. Dans ce cas, l'AT est couplé chimiquement à la protéine porteuse au niveau de la position 5 du noyau thiophène. Le conjugué ainsi synthétisé est désigné SAB-5S-AT (figure II-2). Cette stratégie dérive de l'identification de sulfoxydes de thiophène lors de l'activation de l'IAT chez le rat et de leur piégeage par des composés nucléophiles comme le mercaptoéthanol. En effet, il est fort probable que la structure des adduits de l'AT avec les protéines ressemble à celle des métabolites de piégeage identifiés avec l'IAT. Plus loin dans ce chapitre, nous présenterons les différences de reconnaissance obtenues avec les sera de lapines immunisées avec soit la SAB-N-AT soit la SAB-5S-AT.

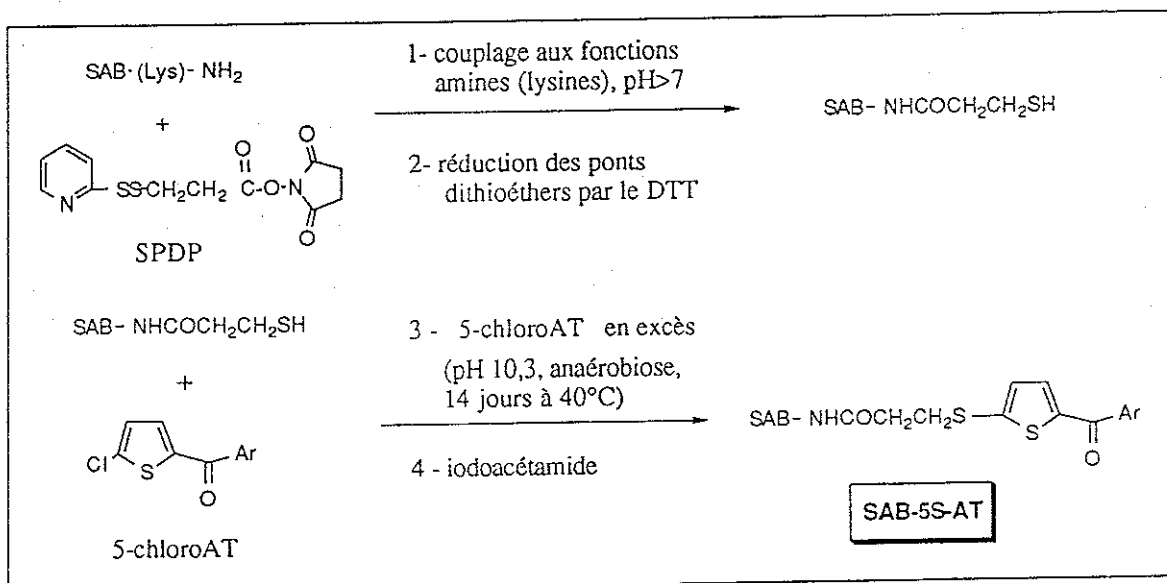


Figure II-2. Principe du couplage de la SAB au noyau thiophène de l'AT (Valadon, 1992).

II-2 Couplage de la β -lactoglobuline (β LG) au niveau du noyau thiophène de l'acide tiénilique (β LG-5S-AT)

L'immunisation d'animaux par un conjugué protéine porteuse-haptène entraîne fréquemment une production d'anticorps qui reconnaissent également la protéine porteuse native. Par conséquent, il est souvent nécessaire de faire un nouveau couplage avec une seconde protéine porteuse. Ceci permet de s'impartir de la reconnaissance croisée de la première protéine et améliore la qualité des tests qui ont pour but la détermination de l'efficacité de l'immunisation. Ainsi, un conjugué β LG-5S-AT a dû être synthétisé afin de pouvoir tester les anticorps obtenus après immunisation des lapins avec le conjugué SAB-5S-AT.

II-2-1 Principe du couplage

Bernard Desfosses a repris la stratégie utilisée par Philippe Valadon précédemment (Valadon, 1992) pour réaliser la synthèse de la β LG-5S-AT. Le couplage s'effectue globalement en deux étapes (figure II-2). La première consiste en une activation de la protéine porteuse afin d'augmenter le nombre de fonctions réactives susceptibles de réagir avec l'AT. La seconde constitue l'étape de couplage proprement dite entre l'AT et cette protéine porteuse modifiée. Cette seconde étape repose sur la mise en évidence par Patrick Dansette de la possibilité de substituer l'atome de chlore du 5-chloro AT par un thiol à pH 10. Par conséquent, l'activation de la protéine porteuse consiste à augmenter le nombre de fonctions thiol qu'elle porte. Cette étape s'effectue par réaction du N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) sur les fonctions amines libres des résidus lysines de la protéine. 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. La protéine thiolée ainsi obtenue est incubée en présence du 5-chloro AT. Les groupements thiols qui n'auraient pas réagi avec le 5-chloro AT sont bloqués par l'iodoacétamide. Les conditions opératoires précises sont décrites dans la partie expérimentale p. 138.

II-2-2 Résultat

Synthèse de la β LG-5S-AT.

La β LG possède 30 résidus lysines. L'efficacité de la première étape est mesurée par un dosage des thiols par la réaction d'Ellman. Cette étape permet une activation d'environ 67% des résidus lysines (20 thiols/ β LG). L'utilisation de 5-chloro AT radiomarqué sur la fonction cétone permet de déterminer le rendement de l'étape de couplage. Ainsi, le nombre de molécule d'AT incorporées par protéine thiolée s'élève à 11 soit un rendement de 55%.

Caractérisation de la β LG-AT

La figure II-3 compare les spectres d'absorption UV-visible de la BLG, de la BLG-5S-AT et du dérivé 5-S-mercaptoéthanol-AT (MEA-5S-AT) obtenu par substitution du chlore du 5-chloro AT par le mercaptoéthanol.

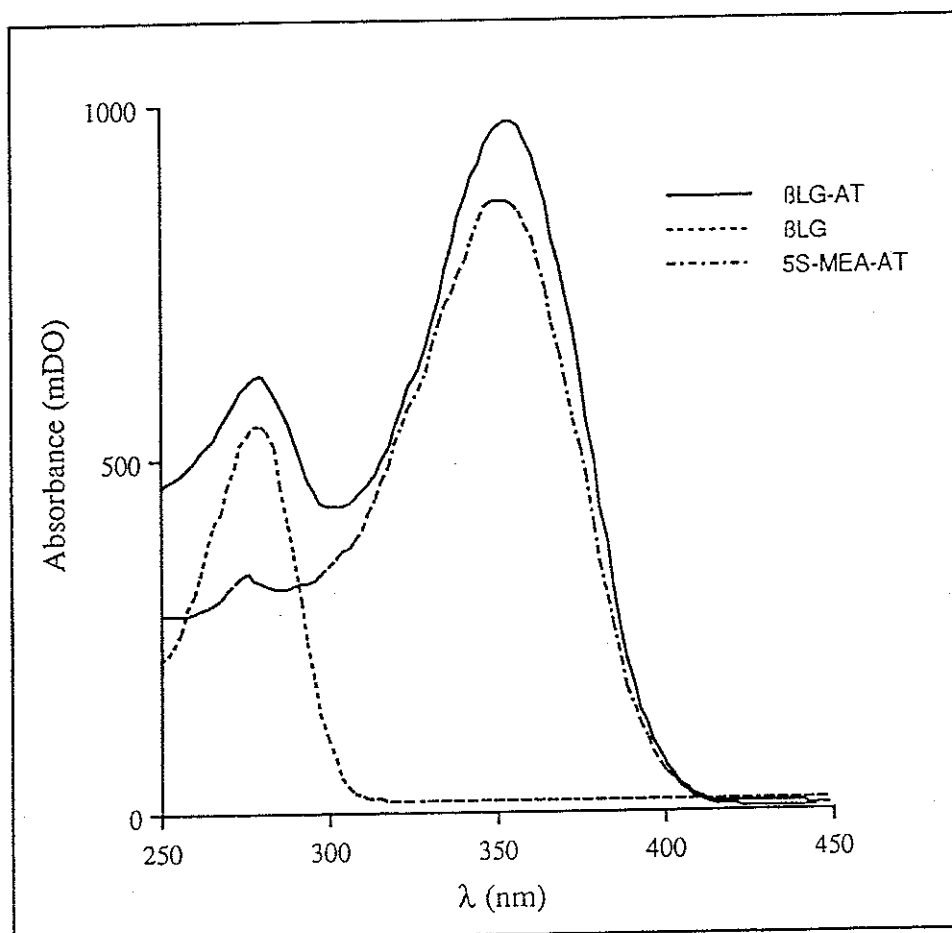


Figure II-3. Comparaison des spectres d'absorption UV-visible de la β LG-AT, de la BLG non modifiée et du dérivé mercaptoéthanol-5S-AT (MEA-5S-AT).

En plus du pic d'absorption à 280 nm des acides aminés aromatiques présents au sein de la BLG, la BLG-5S-AT présente un second pic localisé à 364 nm (coefficient d'absorption molaire de l'AT de $15300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Ce pic correspond à celui trouvé avec le MEA-5S-AT qui présente un pic similaire à 362 nm (coefficient d'absorption molaire de $15700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

II-3 Obtention d'anticorps spécifiques de la fixation covalente de l'AT sur des protéines

II-3-1 Immunisation des animaux, obtention des sera et détermination de l'efficacité de l'immunisation.

Le protocole des immunisations est décrit de façon détaillée p. 139. Brièvement, 5 lapines New Zealand âgées de 3 mois ont été immunisées avec la SAB-5S-AT (22 molécules d'AT/SAB, (Valadon, 1992)). Le sang est prélevé 15 jours après chaque rappel afin de préparer le serum qui est maintenu à -40°C. Les différents sera obtenus sont ensuite testés par la technique d'Ouchterlony afin de contrôler l'apparition d'une réponse dirigée contre l'AT lié aux protéines. L'efficacité de l'immunisation est estimée d'après l'intensité des arcs de précipitation obtenus entre la SAB-5S-AT et les différents sera des 5 lapines lors d'expériences de double diffusion en gel d'agarose (Valadon, 1992). Dans les études ultérieures, la fraction immunoglobuline de la lapine qui reconnaît la SAB-AT avec la plus grande intensité est utilisée. Cette fraction provient d'une précipitation au sulfate d'ammonium de différents prélèvements du même animal. Elle est systématiquement désignée anti-AT dans le reste du travail. Les caractéristiques de cette fraction anti-AT ont ensuite été déterminées de façon fine par la technique ELISA.

II-3-2 Principe de l'ELISA

La technique ELISA a été retenue pour tester la réponse anti-BLG-5S-AT des anti-AT. Cette technique permet la détermination de titres de spécificité ainsi que la réalisation d'expériences d'inhibitions. La réalisation des tests ELISA se décompose globalement en 5 étapes principales :

- 1) les puits de microplaques ELISA sont d'abord sensibilisés avec l'Ag à tester,
- 2) les sites d'absorption restés libres sont alors saturés par de la gélatine,
- 3) le serum ou la fraction immunoglobuline à tester est ensuite ajoutée à chaque puits,
- 4) après 1 heure, le second AC, spécifique du premier et couplé à la peroxydase, est ajouté,
- 5) au bout de deux heures, la révélation de l'activité peroxydasique est effectuée.

Le premier et second AC sont toujours dilués dans un tampon PBS contenant du Tween 20 (PBST) et de la gélatine afin d'éviter une absorption non spécifique sur les parois des puits. Des lavages sont également effectués entre chaque étape afin d'éliminer des puits les AC qui n'ont pas réagi avec l'Ag.

II-3-2 Concentration optimale de BLG-5S-AT pour sensibiliser les plaques ELISA

La concentration optimale de l'Ag à utiliser pour sensibiliser les puits est déterminée en utilisant des dilutions fixes de l'AC à tester et en faisant varier la quantité de l'Ag dans les puits. La concentration de l'Ag qui fournit une réponse maximale est ensuite systématiquement utilisée. La figure II-4 montre la variation de reconnaissance des anti-AT en fonction de la concentration de BLG-5S-AT utilisée pour sensibiliser les puits de microplaques ELISA.

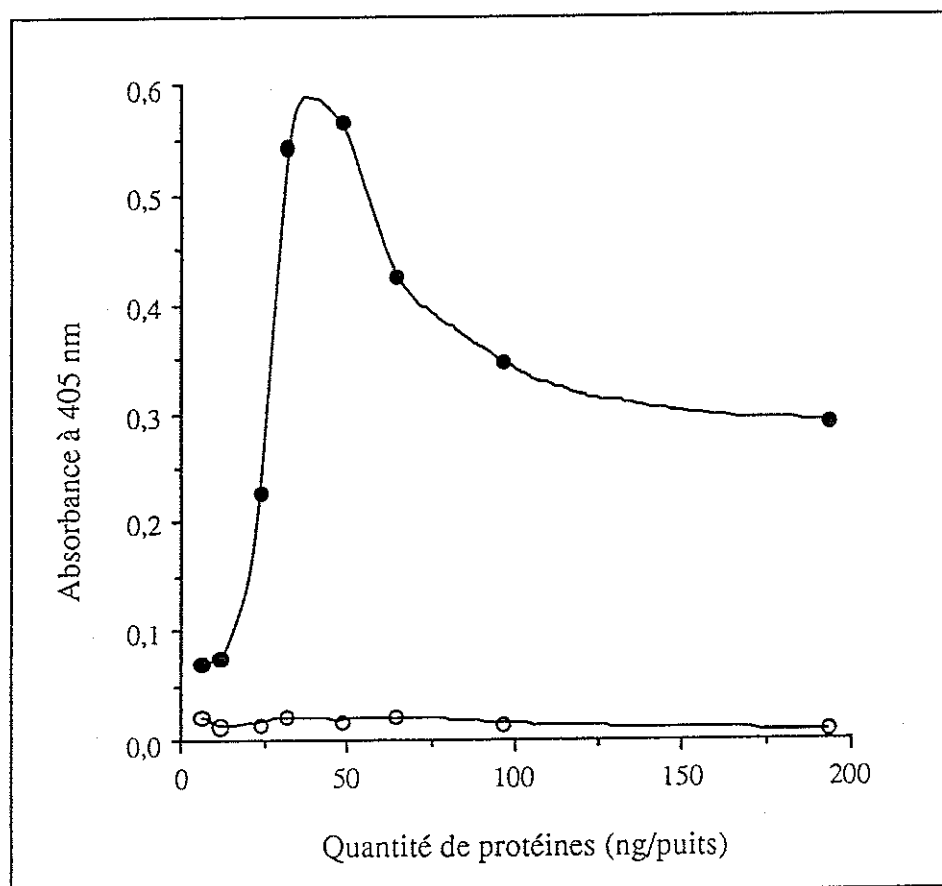


Figure II-4. Sensibilisation des puits de microplaques ELISA par différentes concentrations de BLG-5S-AT (●) ou de BLG non modifiée (○) et reconnaissance par les anti-AT dilués au 1/10 000. Chaque point correspond à la moyenne de l'absorbance à 405 nm déterminée sur des duplicats de chaque concentration. La révélation peroxydasique se fait en 20 minutes avec l'ABTS comme substrat.

La reconnaissance de la BLG-AT par les anti-AT présente l'allure d'une courbe en cloche dont le maximum correspond à une concentration de BLG-5S-AT de 47,5 ng/puits (soit 15 pmoles d'AT/puits). La sensibilisation des puits par des concentrations croissantes mais inférieures à cette valeur seuil se traduit par une augmentation de la réponse des anti-AT. Cette

augmentation s'explique par la densité croissante de motifs AT présents dans les puits et susceptibles de réagir avec les AC. Pour des concentrations supérieures à 47.5 ng/puits de BLG-5S-AT, une diminution de la reconnaissance est observée. Cette dernière tend vers un plateau quand de fortes quantités de BLG-5S-AT sont ajoutées. Ceci s'explique probablement par une inaccessibilité des AC à l'ensemble des motifs AT due à l'augmentation de la quantité de protéines présentes au fond des puits. Il est intéressant de noter que même de fortes concentrations de BLG non modifiée ne sont pas reconnues par les anti-AT. La concentration optimale de BLG-5S-AT pour sensibiliser des microplaques ELISA est donc de 47.5 ng/puits. Cette concentration sera systématiquement utilisée lors des expériences ultérieures.

II-3-3 Titration des anti-AT contre la BLG-AT

La figure II-5 compare la reconnaissance de la BLG-5S-AT à celle de la BLG par des dilutions successives des anti-AT.

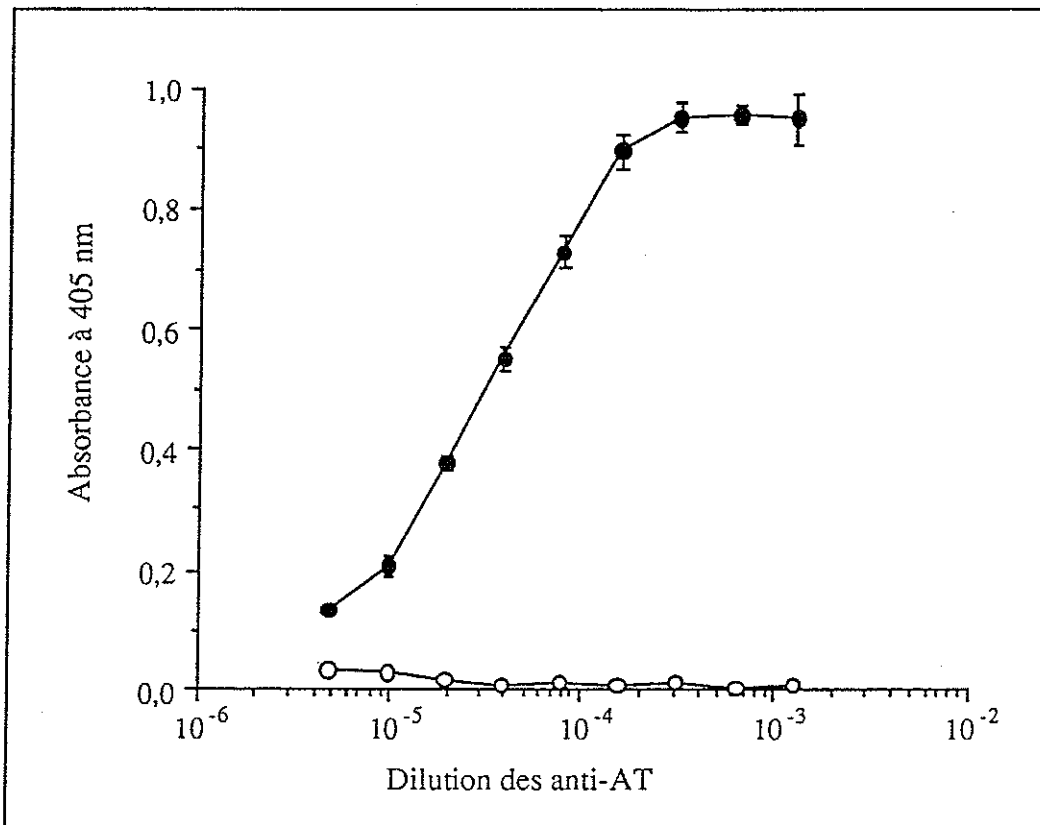


Figure II-5. Détection d'anticorps dirigés contre la BLG-5S-AT par ELISA. Les puits sont sensibilisés avec soit 47.5 ng de BLG-5S-AT (15 pmoles AT/puits) (●) soit 47.5 ng de BLG non modifiée (○). les anti-AT sont dilués du 1/800 au 1/204800. Chaque point correspond à la moyenne plus ou moins la déviation standard de l'absorbance à 405 nm déterminés sur des triplicates de chaque concentration. La révélation peroxydasique de 20 minutes avec l'ABTS comme substrat.

Résultats

L'immunisation de la lapine avec la SAB-5S-AT entraîne la production d'AC spécifiquement dirigés contre l'AT lié à la BLG. En effet, aucune reconnaissance de la BLG native n'est observée même pour la concentration d'anti-AT la plus importante utilisée, à savoir 1/800 ème. Le titre des anti-AT contre la BLG-5S-AT, défini par la dilution donnant la moitié de l'absorbance maximale, s'élève au 1/35 000.

II-3-4 Titration des anti-AT contre des adduits de l'IAT

Nous avons étudié la capacité des sera à reconnaître la fixation covalente de l'IAT sur des protéines microsomaux après métabolisation. Pour ceci, de l'IAT radiomarqué est incubé en présence de microsomes de rats traités au clofibrate avec ou sans système générateur de NADPH suivant le protocole décrit p. 141. Les incubats sont ensuite traités par HCl 2N afin de stabiliser les adduits protéiques de l'IAT (Valadon, 1992). L'IAT libre est ensuite extrait par plusieurs lavages au méthanol puis les protéines sont remises en suspension partielle par l'ajout de soude 0.1N. Le dosage des protéines n'est pas fiable en raison des traitements drastiques subis par les échantillons (ajout de HCl principalement). Par contre, l'utilisation d'IAT radiomarqué permet de connaître la quantité d'adduits déposés dans les puits. La figure II-6 compare ainsi la reconnaissance des adduits de l'IAT aux protéines microsomaux par deux types de sera : le premier serum provient d'une immunisation par la SAB-5S-AT et le second provient d'une immunisation par la SAB couplée à l'AT *via* son extrémité carbonyle (SAB-N-AT) (Pons, 1989). Malgré le fait que les 2 conjugués présentent une densité de molécules d'AT très similaire (20 dans le cas de la SAB-5S-AT contre 22 dans celui de la SAB-N-AT), il existe de fortes différences dans les réponses des 2 types de serum. La capacité de reconnaissance d'adduits de l'IAT d'une lapine immunisée avec la SAB-5S-AT est plus de 100 fois supérieure à celle d'une lapine immunisée avec la SAB-N-AT. En effet, les titres contre les adduits protéiques de l'IAT des 2 sera obtenus sont respectivement de 1/128 000 et 1/1 200. Ce résultat illustre l'importance de reproduire la structure des adduits covalents lors de la synthèse des conjugués servant à l'immunisation des animaux.

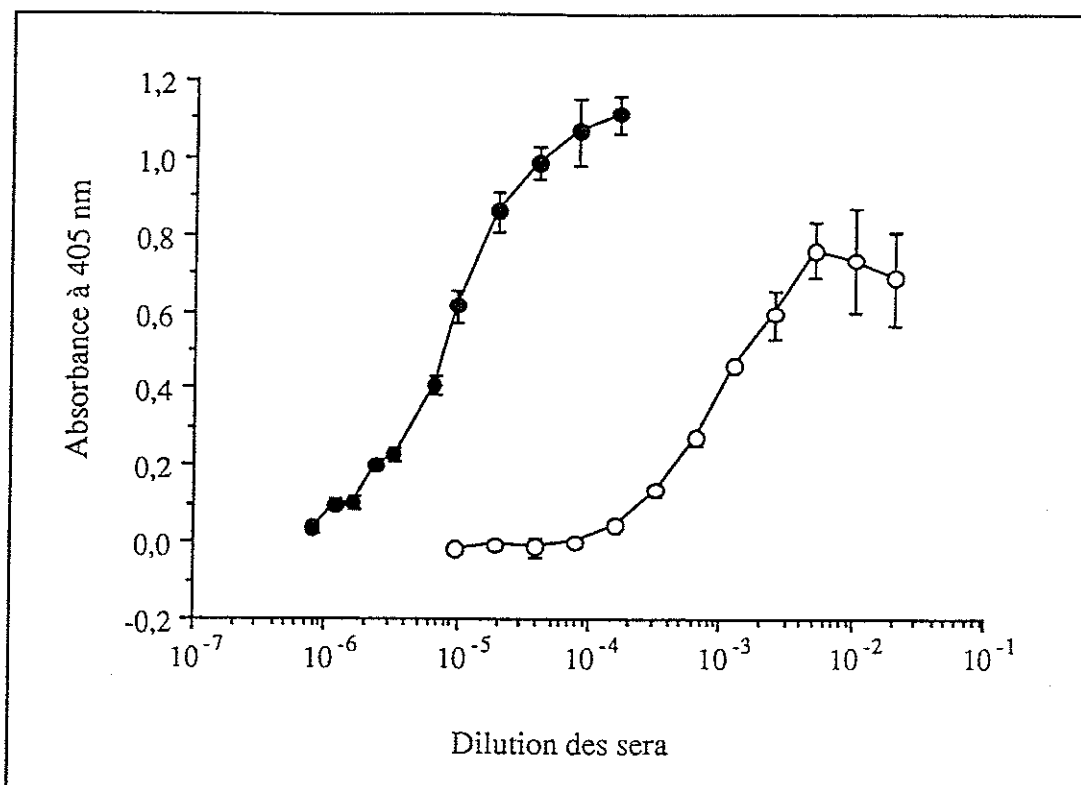


Figure II-6. Reconnaissance des adduits de l'IAT aux protéines par ELISA. Les puits sont sensibilisés par 20 pmoles d'IAT liés aux protéines microsomiales de rats traités au clofibrate. Des séras de lapins immunisés soit avec de la SAB-5S-AT (●) soit avec de la SAB-N-AT (○) sont ajoutés dans les puits. Les gammes de dilutions utilisées sont respectivement de 1/6400 à 1/1 228 800 et de 1/50 à 1/102 400. Chaque point correspond à la moyenne de 3 valeurs corrigée de la déviation standard.

II-3-5 Expériences d'inhibition compétitive

La capacité de différents composés à inhiber la reconnaissance de la BLG-5S-AT par les anti-AT a été testée en ELISA. Dans ce but, les anti-AT sont préincubés pendant une nuit en présence de dilutions successives des différents composés à tester avant d'être déposés dans les puits. Les anti-AT sont dilués au 1/25 000 de façon à obtenir une absorbance d'environ 0.5 unités. Pour cette dilution, proche du titre, les anti-AT ne sont pas en concentration saturante et l'effet de composés potentiellement inhibiteurs peut être observé.

Nous avons testé l'influence des composés dont la structure est présentée sur la figure II-7 sur la reconnaissance de la BLG-5S-AT par les anti-AT. Parmi ceux-ci, l'acide dichlorophénoxyacétique (DCPA) présente une structure relativement éloignée du conjugué BLG-5S-AT car il ne possède pas de fonction cétone ni de noyau thiophène.

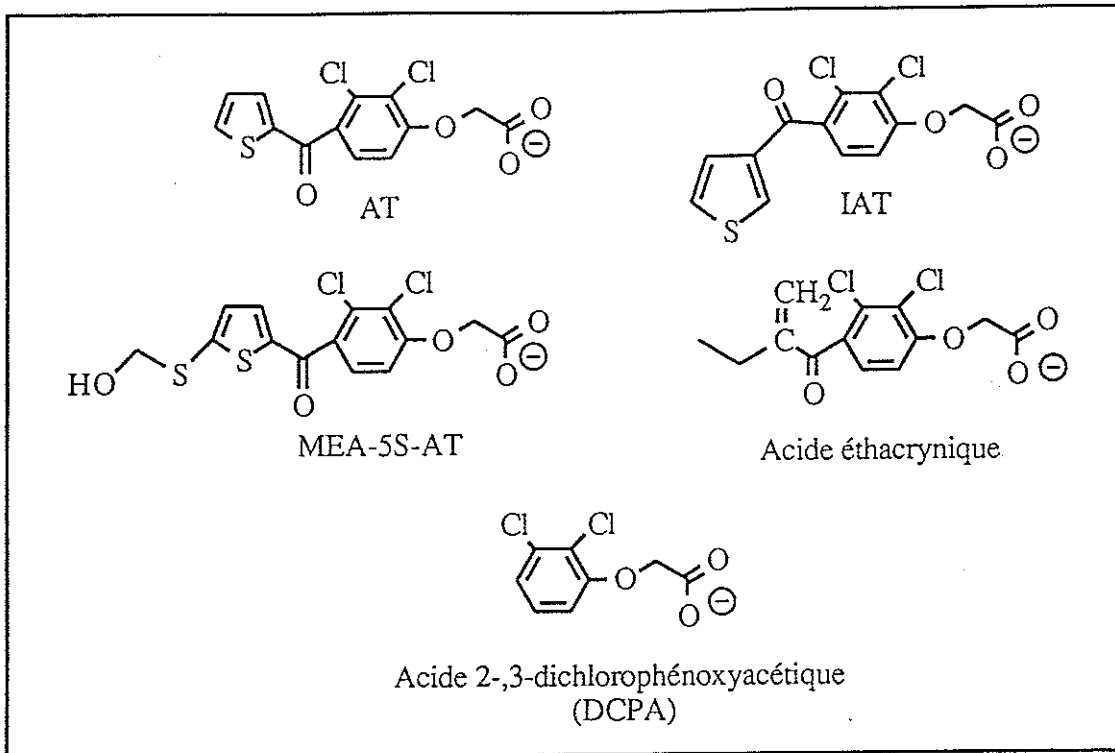


Figure II-7. Structure des molécules testées pour inhiber la reconnaissance de la BLG-5S-AT par les anti-AT.

Les résultats présentés sur la figure II-8 permettent de déterminer les IC_{50} des composés testés. Cette valeur correspond à la concentration du composé qui provoque une inhibition de 50% de la réponse des anti-AT préincubés en absence de tout inhibiteur. La préincubation des anti-AT avec des concentrations de DCPA comprises entre 10^{-9} et 10^{-3} M n'interfère pas avec la reconnaissance de la BLG-5S-AT. A l'opposé, le composé structurellement le plus proche de la BLG-5S-AT est le MEA-5S-AT. Ce composé est le plus puissant inhibiteur de la reconnaissance de la BLG-5S-AT par les anti-AT et possède une IC_{50} de 2.10^{-7} M. Sa capacité à rentrer en compétition avec la BLG-5S-AT est 30 fois supérieure à celle de l'AT (IC_{50} de 6.10^{-6} M). Ce dernier inhibe 3 fois plus la reconnaissance de la BLG-5S-AT par les anti-AT que l'IAT (IC_{50} de 3.10^{-5} M). L'acide éthacrynique dont dérive la structure de l'AT inhibe moins efficacement la réponse des anti-AT (IC_{50} de 10^{-4} M).

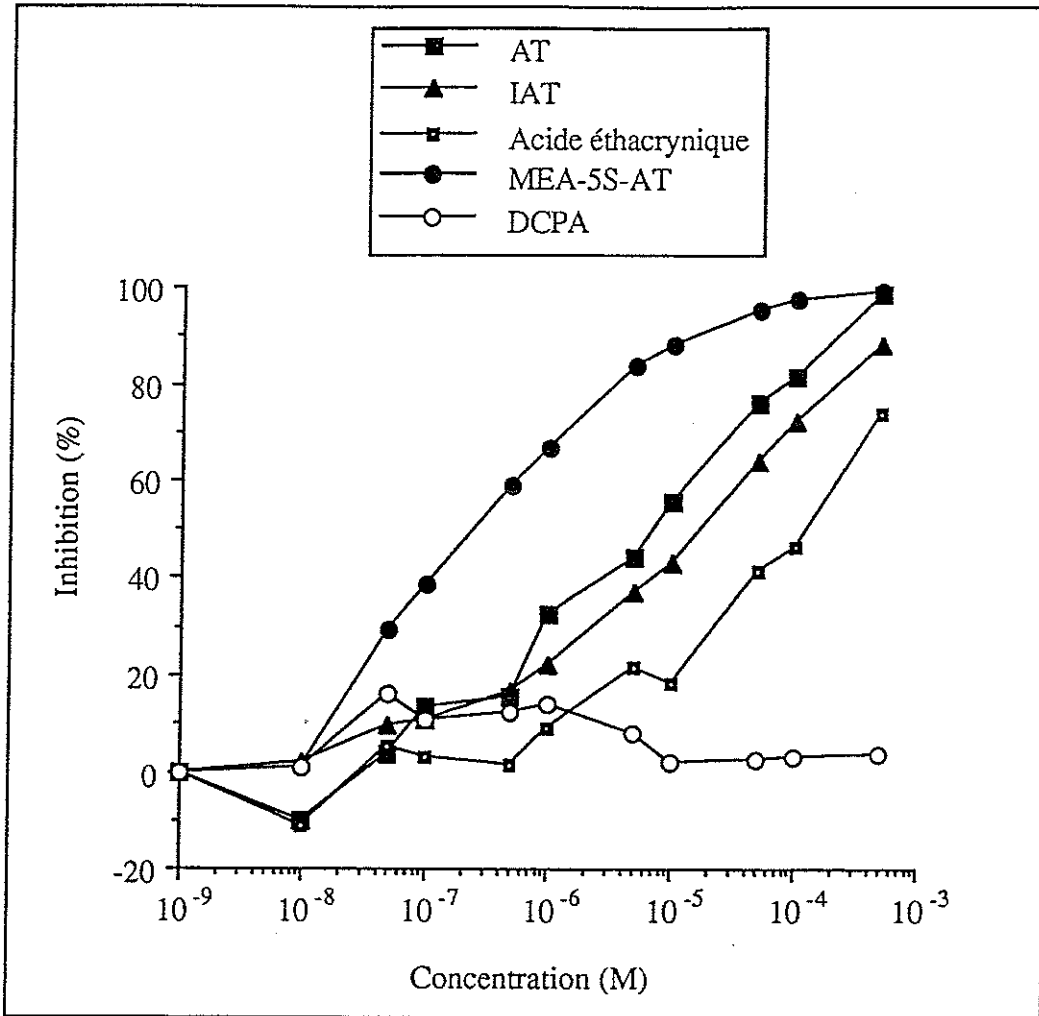


Figure II-8. Influence de la préincubation de différents composés avec les anti-AT sur la reconnaissance de la BLG-5S-AT. Les puits de microplaques ELISA sont sensibilisés par 47.5 ng de BLG-5S-AT (15 pmoles d'AT/puits). Les anti-AT (1/25 000) sont préincubés avec des dilutions successives des différents composés pendant une nuit à 4°C et sont ensuite ajoutés dans les puits. Chaque concentration est testée en duplicata.

Philippe Valadon avait préalablement utilisé cette technique d'inhibition de la reconnaissance des anti-AT par différents composés mais en sensibilisant les plaques ELISA avec des protéines microsomiales de rat ayant fixé des métabolites de l'AT ou de l'IAT (Valadon, 1992). Les IC₅₀ sont alors très inférieures à celles déterminées en sensibilisant les plaques ELISA avec la BLG-5S-AT (tableau II-1).

Tableau II-1. Inhibition compétitive par des analogues de l'AT de la reconnaissance des métabolites de l'IAT ou de la BLG-5S-AT par les anti-AT. Concentration (en M) pour laquelle chaque analogue inhibe le signal de l'ELISA de 50% ; les plaques sont sensibilisées avec soit 20 pmoles d'IAT fixé de façon covalente aux protéines microsomales de rats préalablement traités au clofibrate soit avec 15 pmoles d'AT lié à la BLG (BLG-5S-AT).

Inhibiteur	Plaques sensibilisés avec	
	des métabolites de l'IAT	de la BLG-5S-AT
MEA-5S-AT	2.3×10^{-9}	2×10^{-7}
AT	7.5×10^{-9}	6×10^{-6}
IAT	17×10^{-9}	2×10^{-5}
Acide éthacrynique	50×10^{-9}	10^{-4}
DCPA	3.3×10^{-5}	*

* pas d'inhibition observée dans la gamme de concentrations testées.

II-3-6 Conclusion

Le but de cette étude était de déterminer l'efficacité de l'immunisation d'animaux par un conjugué constitué de molécules d'AT liées au niveau de la position 5 du noyau thiophène à la SAB (SAB-5S-AT). Ainsi, une étude préliminaire montrait que les sera d'animaux immunisés avec ce conjugué étaient capables de reconnaître des adduits de l'IAT aux protéines microsomales hépatiques de rat traités au clofibrate en ELISA (titre 1/128 000). Cette reconnaissance est plus de 100 fois supérieure à celle obtenue quand les animaux sont immunisés avec un conjugué dans lequel l'AT est lié aux protéines par son extrémité dichlorophénoxyacétique (SAB-N-AT). La fraction d'immunoglobulines préparée à partir de l'animal pour lequel l'immunisation par la SAB-5S-AT s'est révélée la plus efficace a été retenue pour la suite de l'étude. Nous avons désigné cette fraction d'immunoglobulines anti-AT. En raison de l'immunisation, les anti-AT présentent une réponse assez importante dirigée contre la SAB non modifiée. Cette reconnaissance parasite entraînait des bruits de fond relativement élevés lors du test des anti-AT. Pour cette raison, il a été nécessaire de synthétiser un second conjugué suivant le même protocole utilisé pour la SAB-5S-AT. Nous avons ainsi couplé des molécules d'AT à la BLG. Le conjugué ainsi obtenu et désigné BLG-5S-AT, possède 11 molécules d'AT liées au niveau de la position 5 du noyau thiophène. La BLG-5S-AT nous a permis de caractériser les anti-AT en utilisant la technique ELISA. Après avoir déterminé la concentration optimale du conjugué nécessaire pour sensibiliser les plaques ELISA, nous avons mis en évidence une réponse spécifiquement dirigée contre les molécules d'AT liées à la BLG. En effet, le titre de cette reconnaissance de la BLG-5S-AT par les anti-AT s'élève à 1/35 000. De plus, les anti-AT ne reconnaissent pas la BLG non modifiée.

Résultats

Des expériences d'inhibitions compétitives ont permis de déterminer les principaux motifs reconnus par les anti-AT. Ainsi, le MEA-5S-AT, dont la structure est proche de celle de la BLG-5S-AT, inhibe la reconnaissance de ce conjugué par les anti-AT. Viennent ensuite, les analogues structuraux de l'AT ou l'AT lui-même qui présentent des IC₅₀ voisines. Par contre, l'acide dichlorophénoxyacétique qui ne possède pas de noyau thiophène ne rentre pas en compétition avec la BLG-5S-AT dans la gamme de concentrations testée. Les IC₅₀ que nous avons déterminées pour ces composés sont très supérieures à celles déterminées par Philippe Valadon en prenant comme antigène des protéines microsomaux modifiées par la fixation covalente de l'IAT. Ceci s'explique très probablement par une densité d'épitopes présentés par la BLG-5S-AT beaucoup plus importante que celle fournie par les protéines microsomaux alkylées. L'ordre des inhibiteurs reste cependant le même dans les deux études. Lorsque l'antigène est constitué de protéines alkylées par l'IAT, il semble exister très peu de différences entre les IC₅₀ du MEA-5S-AT et celles de l'AT ou de l'IAT (tableau II-1). Par contre, lorsque la BLG-5S-AT est utilisée comme antigène du test ELISA, la capacité du MEA-5S-AT à inhiber la reconnaissance des anti-AT est très largement supérieure à celle des autres composés (minimum 30 fois dans plusieurs expériences indépendantes). Ainsi notre étude montre que les anti-AT reconnaissent la partie de l'AT engagée dans la liaison avec les protéines porteuses BLG ou SAB. Nous disposons donc d'un outil puissant permettant de détecter la fixation covalente de l'AT ou de son isomère sur les protéines après activation métabolique de ces deux composés.

II-4 Détection de la fixation covalente de l'AT et de l'IAT sur les protéines microsomales après activation métabolique

Le protocole que nous avons retenu pour étudier la spécificité de la fixation covalente de l'AT ou de son isomère sur les protéines microsomales se décompose en 7 étapes :

- 1) incubation d'AT ou d'IAT en présence de microsomes,
- 2) précipitation des protéines et extraction de l'AT/IAT libre par des solvants organiques,
- 3) remise en suspension des protéines dans du SDS 1%,
- 4) réduction des ponts dissulfures par le mercaptoéthanol à chaud,
- 5) séparation électrophorétique des protéines en SDS-PAGE,
- 6) transfert électrophorétique sur feuille de nitrocellulose,
- 7) révélations spécifiques à l'aide d'anticorps.

Les 4 dernières étapes correspondant à la technique de l'immunotransfert. En parallèle à la réalisation des immunotransferts, la fixation covalente totale de l'AT ou de l'IAT sur les protéines est quantifiée. Cette mesure s'effectue par comptage de la radioactivité associée aux protéines après incubation d'AT ou d'IAT radiomarqué en présence d'aliquotes des microsomes. Les valeurs de fixation covalente de l'AT et de son isomère dans différentes conditions opératoires sont présentés dans le tableau II-2.

Tableau II-2. Mesure de la fixation covalente de l'AT ou de l'IAT sur les protéines microsomales par comptage radioactif.

Type de microsome	Fixation covalente de l'AT (nmole AT/nmole P450)	Fixation covalente de l'IAT (nmole IAT/nmole P450)
pAAH5/MP-4 +NADPH -GSH	2.98 ± 0.10	72.52 ± 3.85
pAAH5/MP-4 +NADPH +GSH	1.02 ± 0.05	7.05 ± 0.41
Foie humain +NADPH -GSH	1.56 ± 0.11	14.65 ± 0.60
Foie humain +NADPH +GSH	0.58 ± 0.02	n.d.

Les valeurs correspondent à la moyenne de trois déterminations ± la déviation standard.

n.d. non détecté.

II-4-1 Spécificité de la fixation covalente de l'AT sur des microsomes de levure exprimant le CYP2C9 humain (pAAH5/MP-4)

Les travaux de Pilar Lopez ont permis de montrer, par des preuves indirectes, que l'AT est un inhibiteur suicide du CYP2C9 (Lopez-Garcia *et al.*, 1994). En effet, l'inactivation du CYP2C9 humain par l'AT suit parfaitement les caractéristiques classiques d'une inhibition suicide quand cette enzyme est exprimée dans la levure (pAAH5/MP-4). Nous avons donc utilisé les anti-AT afin de déterminer la spécificité de la fixation covalente de l'AT sur des microsomes de pAAH5/MP-4 après incubation avec de l'AT. Différentes conditions expérimentales ont été étudiées : incubations (0.2 μ M CYP2C9, 100 μ M AT, 30 minutes à 28°C, protocole décrit p. 137) en absence ou en présence de 1 mM de NADPH et/ou de 5 mM de GSH. La figure II-9 montre des immunotransferts utilisant les anti-AT pour révéler les adduits covalents de l'AT sur les protéines microsomales de levures exprimant le CYP2C9 humain. En absence de NADPH, aucun adduit protéique n'est révélé démontrant l'absence de fixation covalente de l'AT sur les protéines quand celui-ci n'est pas métabolisé. Ce résultat est corrélé par l'absence de radioactivité associée aux protéines lors de la détermination quantitative de la fixation covalente. Une information supplémentaire fournie par cette première révélation est l'absence de réactions croisées pour la concentration de protéines microsomales déposées (20 μ g/puits) et la dilution d'anti-AT utilisée (1/10 000, 2nd anticorps au 1/10 000). En effet, aucune protéine présente dans les microsomes de levure pAAH5/MP-4 n'est reconnue par les anti-AT. L'ajout de NADPH au début de l'incubation, se traduit par l'apparition d'une bande intense révélée par les anti-AT. Cette bande correspond à un adduit protéique qui possède une masse moléculaire de 55 kD. D'autres bandes très largement minoritaires sont observables dans la gamme de masse moléculaire comprise entre 55 et 28 kD. Leur contribution à la fixation covalente globale de l'AT est toutefois négligeable. La quantification de la radioactivité montre que la fixation covalente s'élève à environ 3 nmole d'AT/nmole CYP2C9 (tableau II-2). Quand 5 mM de GSH sont ajoutés au début de l'incubation, les anti-AT révèlent la protéine située à 55 kD de façon beaucoup moins intense. De plus, les bandes minoritaires observées en absence de GSH disparaissent. La radioactivité associée aux protéines ne représente plus qu'environ 1 nmole d'AT/nmole de CYP2C9. L'ajout de GSH se traduit donc globalement par une diminution tant qualitative que quantitative de la fixation covalente de l'AT. Plusieurs éléments permettent de supposer que la bande à 55 kD correspond au CYP2C9 alkylé. D'abord, l'inhibition suicide de cette enzyme par la fixation covalente de l'AT sur ce P450 déterminée indirectement par Pilar Lopez. Ensuite, l'absence d'autres adduits détectés par les anti-AT. En effet, les anti-LKM₂ révèlent cette même bande de 55 kD sur une bandelette de nitrocellulose correspondant à une incubation réalisée avec du NADPH et du GSH. Ainsi, la cible unique d'alkylation de l'AT en présence de GSH correspond au CYP2C9.

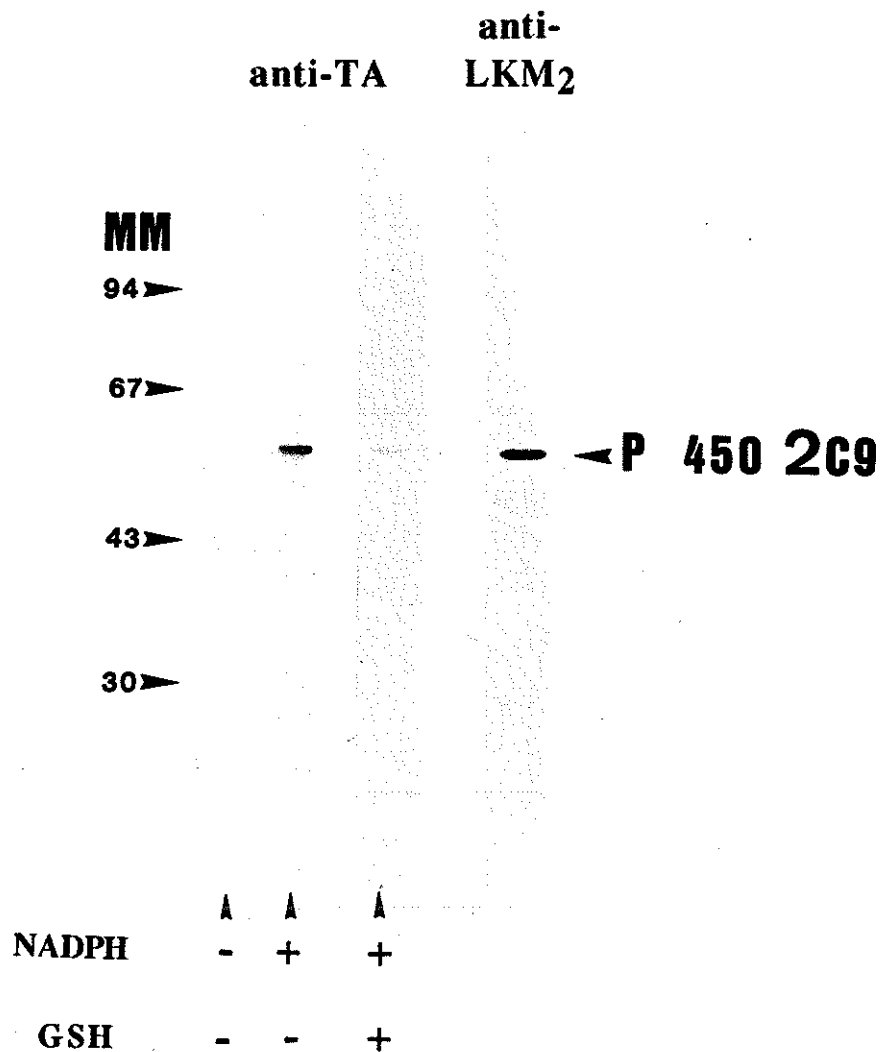


Figure II-9. Immunotransferts d'incubations d'AT en présence de microsomes pAAH5/MP-4 suivant différentes conditions (\pm NADPH et GSH). Incubations $0.2 \mu\text{M}$ CYP2C9, $100 \mu\text{M}$ AT, $\pm 1 \text{ mM}$ NADPH et $\pm 5 \text{ mM}$ GSH, 30 minutes à 28°C . Extraction de l'AT libre et séparation des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur gel à 9% en polyacrylamide avec des dépôts de $15 \mu\text{g/puits}$. Transfert sur nitrocellulose pendant 2 heures à 200 mA. Révélation avec les anti-AT ou les anti-LKM2 dilués au 1/10 000, 2nd AC couplé à la peroxydase au 1/10 000 et au 1/40 000 respectivement. Substrat de la peroxydase: luminol (kit Amersham). MM: masses moléculaires de référence (en kDalton).

II-4-2 Spécificité de la fixation covalente de l'IAT sur des microsomes de levure pAAH5/MP-4

La figure II-10 montre les profils d'alkylation obtenus avec l'isomère de l'IAT sur les protéines microsomiales de levures exprimant le CYP2C9 humain (pAAH5/MP-4).

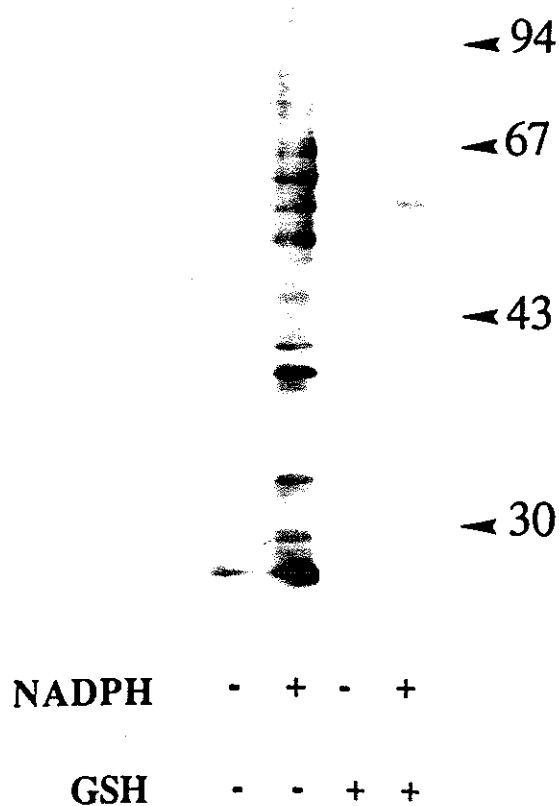


Figure II-10. Immunotransferts d'incubations d'IAT en présence de microsomes pAAH5/MP-4 suivant différentes conditions (\pm NADPH et GSH). Incubations $0.2 \mu\text{M}$ CYP2C9, $100 \mu\text{M}$ IAT, $\pm 1 \text{ mM}$ NADPH et $\pm 5 \text{ mM}$ GSH, 30 minutes à 28°C . Extraction de l'IAT libre et séparation des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur gel à 9% en polyacrylamide avec des dépôts de $15 \mu\text{g}$ /puits. Transfert sur nitrocellulose pendant 2 heures à 200 mA. Révélation avec les anti-AT et le 2nd AC couplé à la peroxydase dilués au 1/10 000. Substrat de la peroxydase: luminol (kit Amersham). Masses moléculaires de référence (en kDalton).

En absence de NADPH, l'IAT n'est pas métabolisé et aucun adduit covalent n'est formé. Par contre, l'ajout du cofacteur réduit se traduit par l'apparition de nombreuses bandes révélées par les anti-AT. Celles-ci correspondent principalement à des protéines qui possèdent des masses moléculaires inférieures à 70 kD. Par conséquent et contrairement aux résultats obtenus avec l'AT, Le profil d'alkylation de l'IAT en présence de NADPH n'est pas spécifique d'une protéine unique et apparaît diffus. Ce résultat explique l'importante fixation covalente mesurée par radioactivité (proche de 70 nmole d'IAT/nmole de CYP2C9). En présence de NADPH et de GSH, la fixation covalente de l'IAT demeure aspécifique. Les adduits formés sont principalement localisés dans la région 70-50 kD et correspondent aux protéines alkylées précédemment détectées en absence de GSH. Cependant, l'ajout de GSH dans l'incubation se traduit par une intensité de révélation considérablement atténuée. Ce résultat corrèle la chute de radioactivité associée aux protéines d'un facteur 10 environ comparée à celle mesurée en absence de GSH (tableau II-1).

II-4-3 Spécificité de la fixation covalente de l'AT sur des microsomes hépatiques humains

Nous avons incubés de l'AT en présence de microsomes humains (1 μ M P450 total, 100 μ M AT, 37°C, 30 minutes, protocole décrit p. 137) suivant différentes conditions expérimentales avec ou sans NADPH et/ou GSH. Le résultat des immunotransferts réalisés avec les anti-AT est reporté sur la figure II-11. En absence de NADPH, aucune formation d'adduits n'est détectée par les anti-AT. De plus, aucune reconnaissance parasite de protéines microsomales humaines n'est observable dans les conditions de la révélation (20 μ g de protéines/puits, anti-AT au 1/10 000, 2nd anticorps au 1/50 000). Lorsque du NADPH est ajouté au milieu d'incubation, la radioactivité associée aux protéines s'élève à environ 1.5 nmole/nmole P450 (tableau II-1). Cette fixation covalente correspond principalement à la formation de deux adduits majoritaires. Ces deux protéines possèdent des masses moléculaires de 55 et 34 kD. D'autres adduits de l'AT sont détectables mais avec une intensité beaucoup plus faible et leur contribution à la fixation covalente mesurée en radioactivité doit par conséquent être relativement limitée. L'ajout de GSH au milieu d'incubation se traduit par une baisse de la radioactivité associée aux protéines microsomales. Cette baisse correspond à une disparition partielle des adduits covalents préalablement détectés en absence de GSH. En effet, ne subsiste que l'adduit covalent à 55 kD qui est révélé avec une intensité relativement forte. Par conséquent, la présence de GSH entraîne une spécificité maximale de la fixation covalente de l'AT sur les protéines microsomales de foie humain. La cible de cette alkylation spécifique de l'AT est le CYP2C9 comme le montre la corrélation de cette protéine par les anti-LKM2.

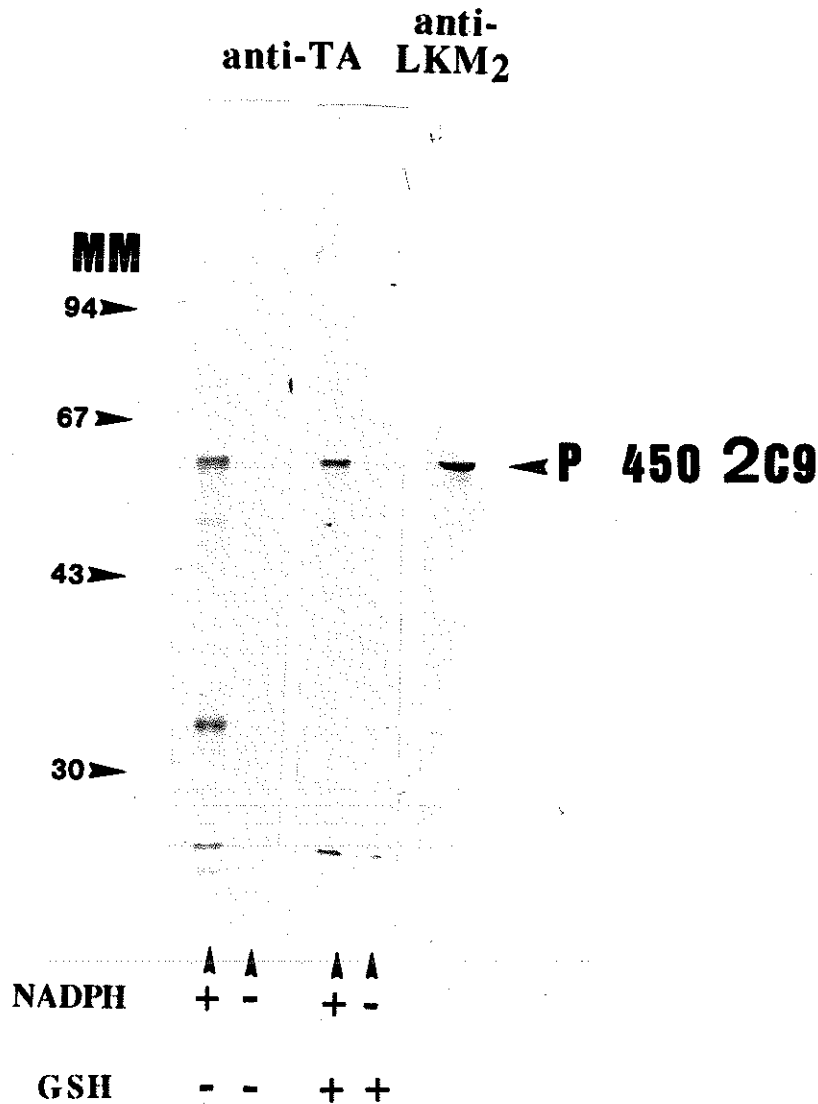


Figure II-11. Immunotransferts d'incubations d'AT en présence de microsomes humains suivant différentes conditions (\pm NADPH et GSH). Incubations $1 \mu\text{M}$ P450, $100 \mu\text{M}$ AT, $\pm 1 \text{ mM}$ NADPH et $\pm 5 \text{ mM}$ GSH, 30 minutes à 37°C . Extraction de l'AT libre et séparation des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur gel à 9% en polyacrylamide avec des dépôts de $20 \mu\text{g}$ /puits. Transfert sur nitrocellulose pendant 2 heures à 200 mA. Révélation avec les anti-AT ou les anti-LKM₂ dilués au 1/10 000, 2nd AC couplé à la peroxydase au 1/10 000 et au 1/40 000 respectivement. Substrat de la peroxydase: luminol (kit Amersham). MM: masses moléculaires de référence (en kDalton).

II-4-4 Spécificité de la fixation covalente de l'IAT sur des microsomes hépatiques humains

La figure II-12 présente les profils d'alkylation des protéines microsomales hépatiques humaines par l'IAT. En absence de NADPH, aucun adduit n'est généré. L'ajout du cofacteur réduit se traduit par une importante fixation covalente aux protéines qui s'élève à environ 15 nmole d'IAT/nmole P450. Dans ce cas, l'immunotransfert montre que la fixation covalente de l'IAT est totalement aspécifique contrairement aux résultats obtenus pour l'AT. L'ajout de GSH se traduit par une disparition totale des adduits précédemment détectés. Ce résultat est corrélé par l'absence de radioactivité significative associée aux protéines microsomales.

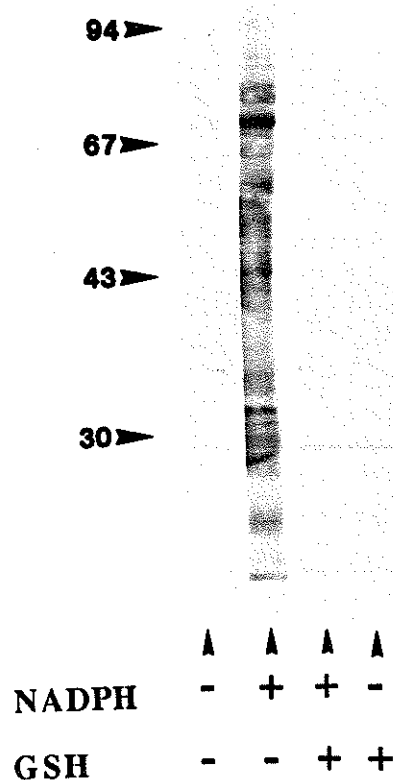


Figure II-12. Immunotransferts d'incubations d'IAT en présence de microsomes humains suivant différentes conditions (\pm NADPH et GSH). Incubations 1 μ M P450, 100 μ M IAT, \pm 1 mM NADPH et \pm 5 mM GSH, 30 minutes à 37°C. Extraction de l'AT libre et séparation des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur gel à 9% en polyacrylamide avec des dépôts de 20 μ g/puits. Transfert sur nitrocellulose pendant 2 heures à 200 mA. Révélation avec les anti-AT et le 2nd AC couplé à la peroxydase dilués au 1/10 000. Substrat de la peroxydase: luminol (kit Amersham). Masses moléculaires de référence (en kDalton).

II-4-5 Spécificité de la fixation covalente de l'AT et de l'IAT sur les microsomes hépatiques humains confirmée par une analyse radiochimique

Nous avons confronté les profils d'alkylation de l'AT et de l'IAT obtenus avec les anti-AT avec une analyse radiochimique des adduits covalents. Pour cela, les feuilles de nitrocellulose utilisées pour les révélations immunologiques ont été chargées dans l'InstantImager™ et la radioactivité associée aux protéines a été acquise *in situ* pendant 14h45. La densité des gris obtenus sur les images est directement proportionnelle au nombre de cpm émis par les composés radiomarqués fixés sur les protéines. La figure II-13 montre les résultats d'une acquisition effectuée sur des bandes de nitrocellulose correspondant à des incubations d'AT ou d'IAT en présence de protéines microsomaux humaines.

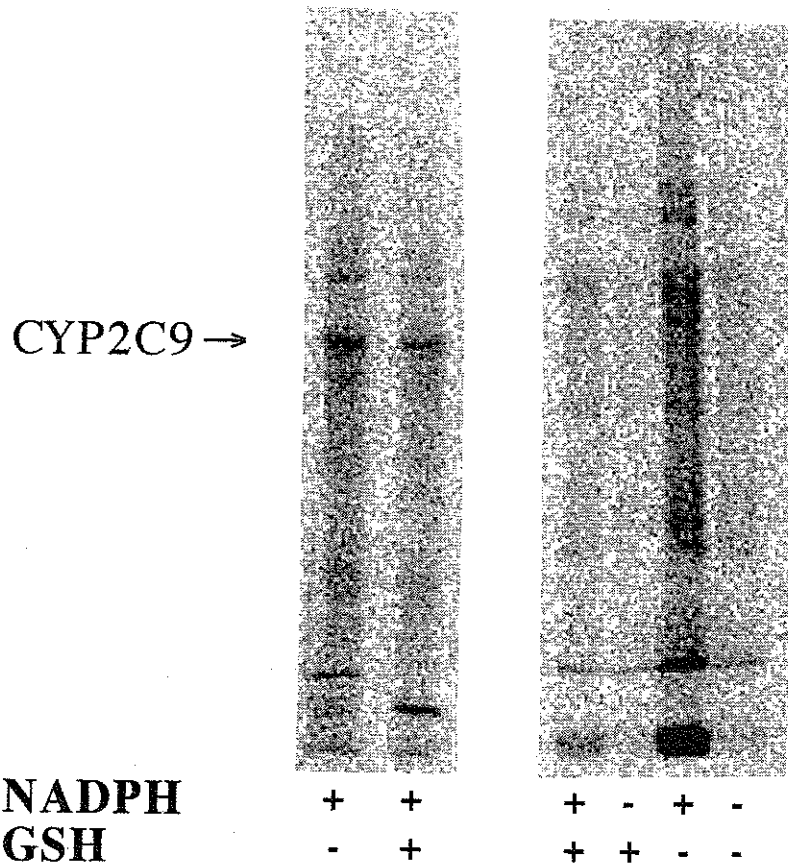


Figure II-13. Analyse radiochimique d'incubations d'AT (à gauche) et d'IAT (à droite) en présence de microsomes humains suivant différentes conditions (± NADPH et GSH). Incubations 1 μM P450, 100 μM AT/IAT radiomarqués, ± 1 mM NADPH et ± 5 mM GSH, 30 minutes à 37°C. Extraction de l'AT libre et séparation des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur gel à 9% en polyacrylamide avec des dépôts de 20 μg/puits. Transfert sur nitrocellulose pendant 2 heures à 200 mA. Chargement des bandes de nitrocellulose dans l'InstantImager™ (Packard) et acquisition de la radioactivité pendant 14h45.

En absence de GSH, une bande principale est identifiable. La comparaison des intensités de gris obtenus en présence ou en absence de GSH permet de dire qu'il existe probablement d'autres adduits mais ces derniers sont très largement minoritaires. L'adduit principal correspond au CYP2C9 alkylé. En effet, il migre à une distance correspondant à une masse moléculaire de 55 kD. En présence de GSH, seul cet adduit est détecté. Le fond de radioactivité est en effet plus clair qu'en absence de GSH ce qui indique que la fixation covalente non spécifique de l'AT sur les protéines a disparu. Les adduits de l'IAT sur les protéines hépatiques humaines ne sont détectables que lorsque les incubations contiennent du NADPH mais pas de GSH. L'alkylation de l'IAT revêt alors un caractère aspécifique prononcé qui se traduit par un *continuum* de radioactivité réparti sur la majorité des protéines. Par conséquent, les profils d'alkylation de l'AT et de l'IAT caractérisés par cette analyse radiochimique *in situ* corroborent tout à fait ceux obtenus avec les anti-AT : fixation covalente spécifique de l'AT sur le CYP2C9 et absence totale de spécificité dans le profil d'alkylation de son isomère.

II-4-6 Influence du traitement des adduits par différentes concentrations de mercaptoéthanol sur la stabilité de la fixation covalente de l'AT chez l'homme

Des incubations d'1 mL contenant de l'AT radiomarqué en présence de microsomes humains (P450 total 1 μ M, AT 100 μ M, 30 min. à 37°C, protocole décrit dans la partie expérimentale, p. 137) ont été réalisées. Une mesure de la fixation covalente est effectuée au temps 0 et en double au temps 30 min.. Le reste du volume de l'incubation est alors divisé en 6 aliquotes dans lesquels sont ajoutées différentes quantités de mercaptoéthanol ou du tampon (référence) afin d'obtenir les concentrations en mercaptoéthanol suivantes: 2500, 1250, 625, 312, 156 et 0 μ M. Les différents échantillons sont ensuite incubés pendant 1 heure à 37°C et une mesure de la fixation covalente de l'AT sur les protéines est alors effectuée en double. Ainsi, la stabilité des adduits protéiques de l'AT peut être suivie en fonction de la concentration de mercaptoéthanol ajoutée extemporanément à l'incubation (figure II-14). L'ajout de faibles concentrations de mercaptoéthanol entraîne une baisse de la radioactivité associée aux protéines microsomales. Ce résultat met en évidence une instabilité de certains des adduits covalents formés. Quand la concentration de mercaptoéthanol augmente, la baisse de la fixation covalente de l'AT diminue. En effet, la courbe tend alors vers un plateau correspondant à environ 1 nmole d'AT fixé/nmole de P450 total. La figure II-15 montre l'influence du mercaptoéthanol sur la quantité et la qualité des adduits de l'AT détectés par les anti-AT sur les protéines microsomales hépatiques chez l'homme. En absence de mercaptoéthanol, le CYP2C9 ainsi que l'adduit de 34 kD sont les principales protéines alkylées par l'AT. Quand on ajoute du mercaptoéthanol aux incubats après que les adduits aient été formés, l'intensité de la révélation du CYP2C9 par les anti-AT reste constante. Les adduits formés entre l'AT et le CYP2C9 sont donc relativement stables et ne reflètent pas ou peu la baisse de radioactivité associée aux

Résultats

protéines mesurée sur la figure précédente. Par contre, l'adduit de 34 kD est de moins en moins bien révélé par les anticorps. La baisse de radioactivité associée aux protéines qui est observée lors de l'ajout de mercaptoéthanol provient donc au moins partiellement d'une instabilité de l'adduit de 34 kD.

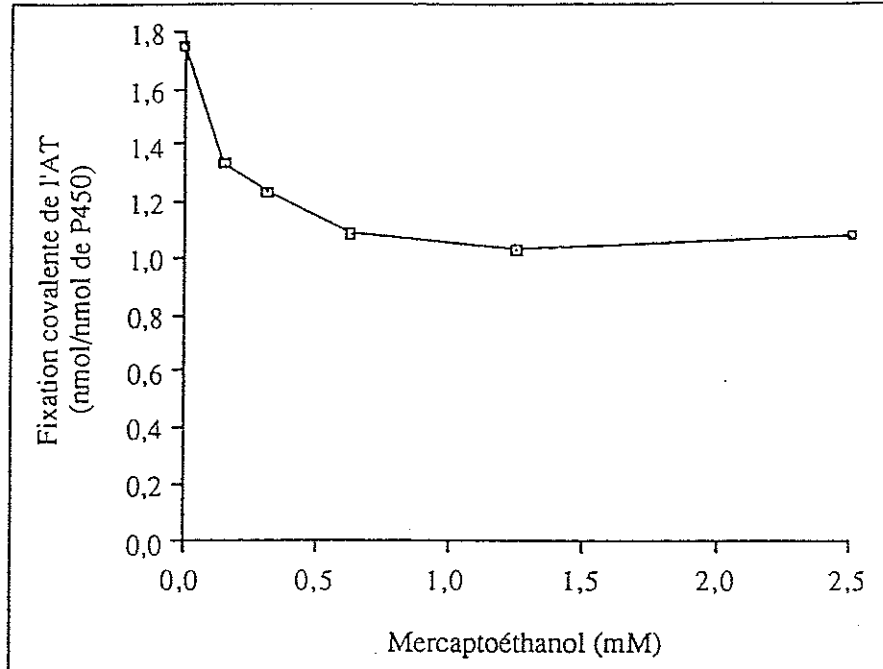


Figure II-14. Influence du mercaptoéthanol rajouté extemporanément sur la stabilité des adduits protéiques microsomaux de l'AT chez l'homme.

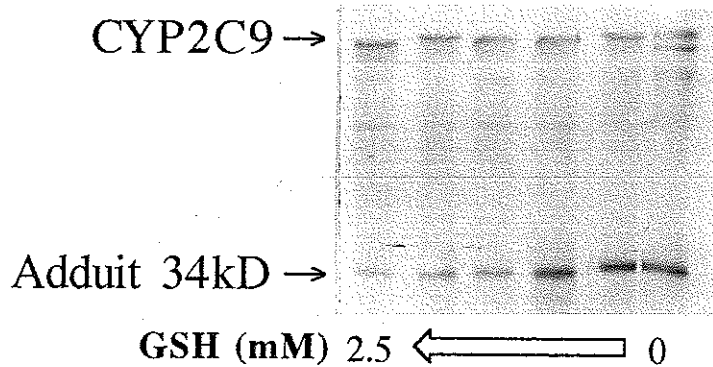


Figure II-15. Effet de l'ajout extemporané de mercaptoéthanol sur la stabilité des adduits de l'AT aux protéines microsomales hépatiques humaines. Incubations 1 μ M P450, 100 μ M AT, 1 mM NADPH, 30 minutes à 37°C. Ajout extemporané de 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,15 et 0 mM de mercaptoéthanol pendant 1 heure à 37°C. Extraction de l'AT libre et séparation des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Dépôts 20 μ g/puits, gel à 9%. Transfert pendant 2 heures à 200 mA. Révélation avec les anti-AT et le 2nd AC couplé à la peroxydase dilués au 1/10 000. Substrat de la peroxydase: luminol (kit Amersham).

II-5 Conclusion

Nous avons défini les caractéristiques de la fixation covalente de l'AT sur les protéines microsomales lors de l'activation métabolique par le CYP2C9. Nous avons ainsi apporté la preuve directe de l'alkylation spécifique du CYP2C9 lorsque cette enzyme est exprimée dans un système hétérologue (levure). En effet, cette enzyme est la seule cible des métabolites électrophiles de l'AT lorsque le GSH est présent au début de l'incubation. Ce résultat confirme ceux précédemment présentés par Pilar Lopez. Celle-ci avait montré de façon indirecte que l'AT est un inhibiteur spécifique et irréversible du CYP2C9 quand ce dernier est exprimé dans la levure. La spécificité du profil d'alkylation obtenu s'explique donc par la fixation préférentielle des métabolites réactifs de l'AT au niveau du site actif du CYP2C9. La persistance de l'alkylation du CYP2C9 en dépit de l'ajout de GSH traduit l'inaccessibilité de ces métabolites réactifs au GSH. Le profil d'alkylation de l'AT obtenu chez l'homme *in vitro* présente également une grande spécificité. En effet, deux protéines sont principalement alkylées : le CYP2C9, l'enzyme responsable de l'activation métabolique de l'AT chez l'homme et une protéine de masse moléculaire de 34 kD. Le CYP2C9 reste la seule protéine alkylée par l'AT lorsque l'incubation est réalisée en présence de GSH. Ce résultat reproduit tout à fait celui déterminé lorsque le CYP2C9 est exprimé dans la levure et montre dans ce cas encore que les molécules d'AT fixées sur le CYP2C9 sont inaccessibles au GSH. Un autre résultat corrobore cette observation : en effet, il est également intéressant de noter qu'une fois formé, l'adduit entre l'AT et le CYP2C9 est relativement stable. En effet, l'ajout extemporané de concentrations croissantes de mercaptoéthanol ne permet pas de détecter une baisse d'alkylation du CYP2C9 en immunotransfert. Ce résultat contraste avec l'instabilité apparente de l'adduit de 34 kD et traduit très probablement la différence d'accessibilité entre les molécules d'AT fixées sur le CYP2C9 et celles liées à la protéine de 34 kD. En particulier, il est fort probable que l'inaccessibilité des molécules d'AT fixées au CYP2C9 soit une conséquence de leur présence au niveau du site actif de l'enzyme. Par conséquent, ces résultats laissent supposer que le CYP2C9 est également inhibé de façon suicide par l'AT *in vitro* chez l'homme. Une telle alkylation sélective du CYP2C9 par l'AT *in vivo* pourrait être impliquée dans l'apparition des anti-LKM₂. Ces anticorps, uniquement présents dans le serum de patients atteints de l'hépatite induite par l'AT, sont en effet très spécifiques du CYP2C9 (Lecoeur *et al.*, 1996). Il est par conséquent possible que la présentation de cette enzyme alkylée au système immunitaire de certains sujets susceptibles entraîne la production des anti-LKM₂.

Malgré la similitude de leurs structures chimiques, le profil d'alkylation obtenu avec l'IAT diffère totalement de celui de l'AT. L'activation de l'IAT réalisée par le CYP2C9 exprimé dans la levure conduit à l'apparition de nombreux adduits non spécifiques. L'ajout d'un composé nucléophile dans les incubations ne se traduit pas par l'apparition d'une spécificité de la fixation covalente de l'IAT sur les protéines. Ce résultat corréle celui trouvé par Pilar Lopez qui a

Résultats

montré indirectement que l'IAT, contrairement à l'AT, ne se comporte pas comme un inhibiteur suicide du CYP2C9 quand cette enzyme est exprimée dans la levure. Chez l'homme, l'alkylation des protéines microsomales par l'IAT est également importante et aspécifique. L'ajout de glutathion dans le milieu d'incubation se traduit par une disparition de tous les adduits de l'IAT. Ce résultat montre que, contrairement au cas de l'AT, l'ensemble des métabolites réactifs générés lors de l'activation de l'IAT peuvent être piégés. Par conséquent, l'IAT n'est également pas un inhibiteur suicide du CYP2C9 *in vitro* chez l'homme.

III Étude de la fixation covalente de l'AT chez le rat

III-1 Motivations du travail

Nous avons montré dans la première partie de ce travail que le rat constituait un modèle animal correct pour appréhender les problèmes de toxicité de l'AT observés chez l'homme. Cette constatation repose sur la grande similarité entre les métabolismes oxydatifs de l'IAT déterminés chez l'homme et le rat. En particulier, la formation de sulfoxydes de thiophènes, des espèces électrophiles très réactives et responsables d'une fixation covalente sur les protéines est observée chez les deux espèces. De plus, la formation de ces métabolites électrophiles est inhibée par les anticorps anti-LKM₂ chez le rat comme chez l'homme. Dans la seconde partie, nous avons mis en évidence chez l'homme le caractère spécifique de la fixation covalente de l'AT et au contraire le caractère diffus de celle de l'IAT sur les protéines microsomaux hépatique. Il paraissait donc intéressant de déterminer les profils d'alkylation de l'AT après activation du médicament par des microsomes hépatiques de rats induits ou non par différents composés. Ainsi, certaines questions viennent automatiquement à l'esprit ; parmi celles-ci : la fixation covalente de l'AT chez le rat présente-t-elle la même spécificité que celle déterminée chez l'homme ? Quelles sont les protéines alkylées ? les profils d'alkylation différent-ils selon que les rats ont été préalablement traités par des inducteurs classiques de P450 ou non ? Quel est le type de traitement qui permet d'obtenir le profil de fixation covalente le plus proche de celui déterminé chez l'homme ? Quelles informations supplémentaires peuvent alors être obtenues par une étude *in vivo* réalisée sur ce type de rats ?

III-2 Fixation covalente de l'AT *in vitro*

Nous avons recherché les profils d'alkylation de l'AT sur les protéines microsomaux de rats contrôles ou de rats traités au clofibrate et au phénobarbital, deux inducteurs classiques de P450 hépatiques. Le protocole retenu pour étudier la spécificité de la fixation covalente de l'AT sur les protéines microsomaux est identique à celui utilisé précédemment décrit dans la section II-4. En parallèle à la réalisation des immunotransferts, la fixation covalente totale de l'AT sur les protéines est quantifiée. Cette mesure s'effectue par comptage de la radioactivité associée aux protéines après incubation d'AT radiomarqué en présence d'aliquotes des microsomes.

Le tableau III-1 regroupe les valeurs de fixation covalente totale sur les protéines microsomaux des rats contrôles, de ceux traités au clofibrate ou au phénobarbital. En absence de GSH, la fixation covalente de l'AT est similaire pour tous les types de microsomes. Par contre, en présence de GSH, des disparités sont observées. En effet, la fixation covalente de

l'AT mesurée sur les microsomes de rats traités au clofibrate est environ 2 fois plus importante que celle déterminée sur des microsomes de rats contrôles. Celle mesurée sur les microsomes de rats traités au phénobarbital est intermédiaire aux deux précédentes.

Tableau III-1. Quantification de la fixation covalente de l'AT (en nmole/nmole de P450) sur différents types de microsomes de rats en fonction de la présence ou non de GSH.

Condition	microsomes		
	de rat contrôle	de rat clofibrate	de rat phénobarbital
+ NADPH - GSH	3.67 ± 0.21	3.45 ± 0.09	3.55 ± 0.07
+ NADPH + GSH	0.23 ± 0.04	0.44 ± 0.09	0.32 ± 0.05

Les incubations contiennent 100 μ M d'AT, 1 μ M de P450, 1 mM de NADPH et 5 mM de GSH (+ GSH), se déroulent à 37°C et durent 30 minutes. Chaque valeur correspond à la moyenne d'au moins trois déterminations indépendantes \pm déviation standard.

III-2-1 Sur microsomes de rats contrôles

La figure III-1 montre les immunotransferts d'incubations d'AT en présence de deux lots différents de microsomes de rat contrôles (P450 total 1 μ M, AT 100 μ M, 30 minutes à 37°C, protocole décrit p. 137) en absence ou en présence de 1 mM de NADPH et/ou de 5 mM de GSH. La révélation des adduits covalents de l'AT est effectuée par les anti-AT. En absence de NADPH dans les incubations, situation dans laquelle l'activation de l'AT n'a pas lieu, aucun adduit covalent de l'AT n'est identifié. Par contre en présence de NADPH, de nombreuses protéines alkylées sont détectés par les anti-AT dans les deux lots de microsomes. Globalement, il s'agit des mêmes adduits dans les deux cas. Plus précisément, parmi les nombreuses protéines ciblées par les métabolites réactifs de l'AT, une d'entre elles semble alkylée de façon majoritaire. Cette protéine possède une masse moléculaire de 52 kD et semble relativement abondante. En présence de GSH, le profil de fixation covalente de l'AT devient nettement plus spécifique. Il ne persiste que 2 ou 3 protéines alkylées. Ces dernières possèdent des masses moléculaires typiques de P450 (région des 50 kD). Parmi ces protéines, celle de 52 kD est de loin la cible principale des métabolites de l'AT dans les deux lots de microsomes utilisés. Cette bande est corévéllée par des anticorps spécifiques du CYP2C11, l'homologue du CYP2C9 humain.

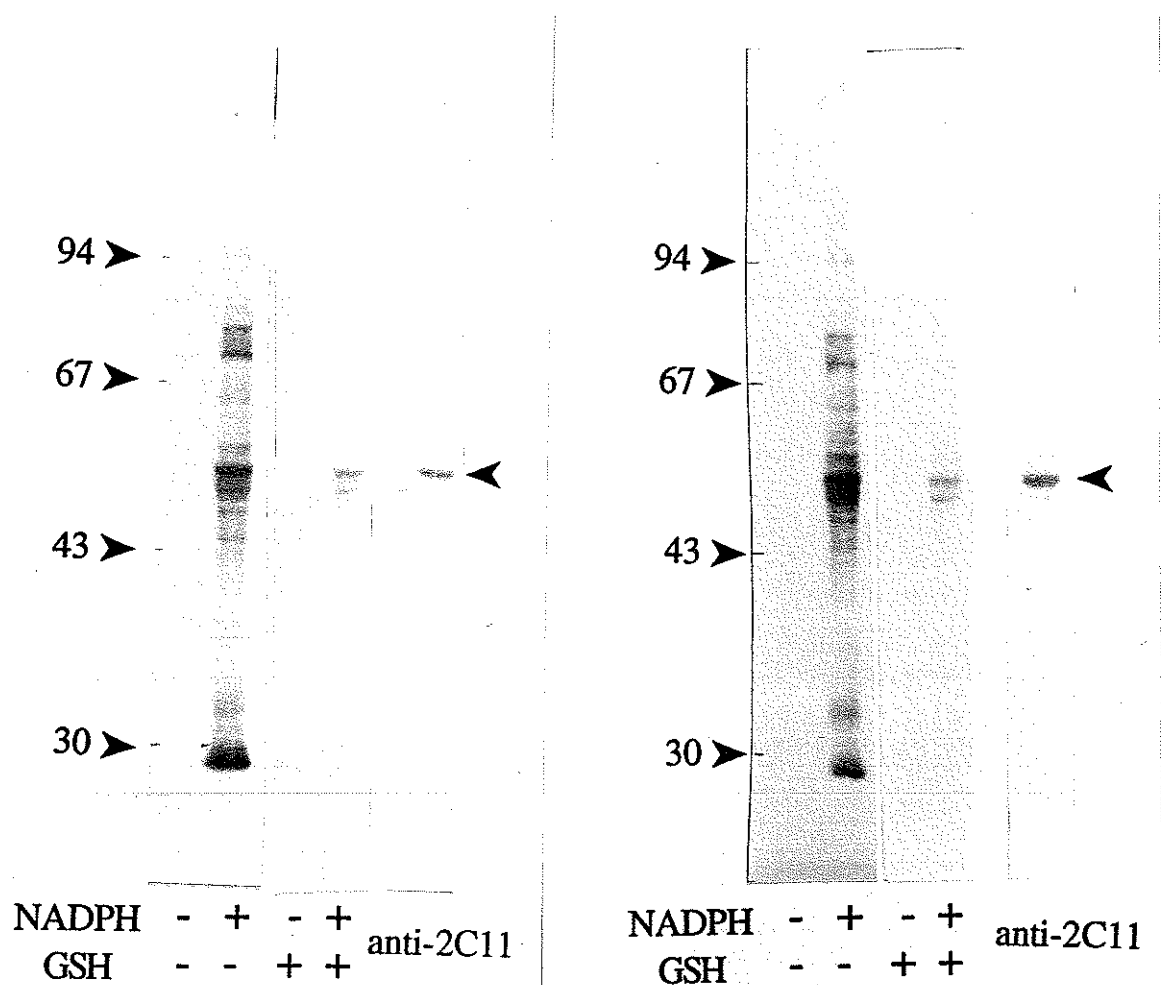


Figure III-1. Immunotransferts d'incubations d'AT en présence de microsomes de 2 lots de rats contrôles différents suivant différentes conditions (\pm NADPH et GSH). Incubations $1 \mu\text{M}$ P450, $100 \mu\text{M}$ AT, $\pm 1 \text{ mM}$ NADPH et $\pm 5 \text{ mM}$ GSH, 30 minutes à 37°C . Extraction de l'AT libre et séparation des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur gel à 9% en polyacrylamide avec des dépôts de $15 \mu\text{g}$ /puits. Transfert sur nitrocellulose pendant 2 heures à 200 mA. Révélation avec les anti-AT ou les anti-2C11 (quand spécifié) dilués au 1/10 000, 2nd AC couplé à la peroxydase au 1/10 000. Substrat de la peroxydase: luminol (kit Amersham). Masses moléculaires de référence (en kDalton).

III-2-2 Sur microsomes de rats induits au clofibrate

La figure III-2 présente les immunotransferts d'incubations d'AT en présence de microsomes de rat traités au clofibrate (P450 total $1 \mu\text{M}$, AT $100 \mu\text{M}$, 30 minutes à 37°C , protocole décrit p. 137) en absence ou en présence de 1 mM de NADPH et/ou de 5 mM de GSH. En absence de NADPH, aucun adduit de l'AT n'est détecté par les anti-AT. Par contre, l'ajout du cofacteur réduit dans les incubations entraîne l'apparition d'un profil d'alkylation non spécifique qui se traduit par la présence de très nombreux adduits. Parmi ceux-ci, une protéine de masse moléculaire de 52 kD semble constituer un adduit important. Quand du GSH est ajouté au milieu d'incubation, le profil d'alkylation devient sélectif et la protéine de 52 kD constitue l'adduit principal. La bande correspondant à cette protéine est également révélée par les anti-2C11, ce qui prouve que, dans ce cas encore, la cible principale de l'AT en présence de GSH est le CYP2C11.

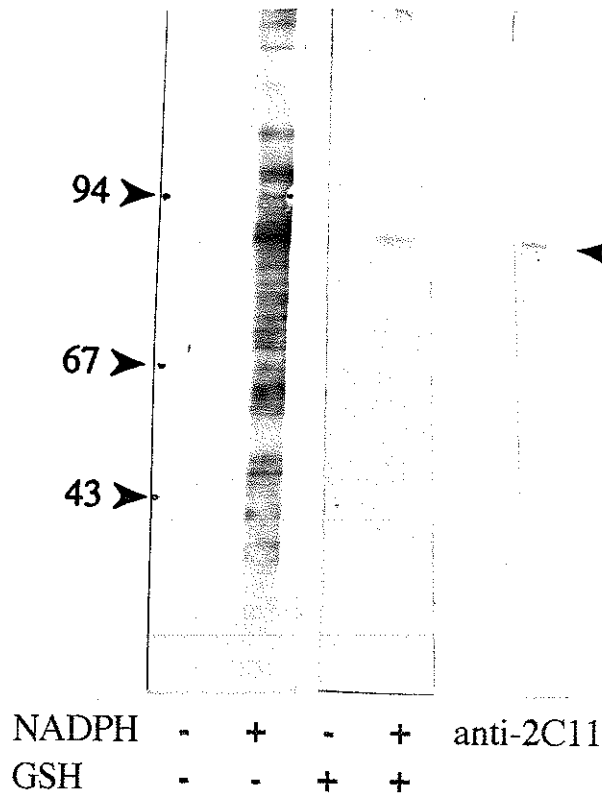


Figure III-2. Immunotransferts d'incubations d'AT en présence de microsomes de rats traités au clofibrate suivant différentes conditions (\pm NADPH et GSH). Incubations $1 \mu\text{M}$ P450, $100 \mu\text{M}$ AT, $\pm 1 \text{ mM}$ NADPH et $\pm 5 \text{ mM}$ GSH, 30 minutes à 37°C . Extraction de l'AT libre et séparation des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur gel à 9% en polyacrylamide avec des dépôts de $15 \mu\text{g}$ /puits. Transfert sur nitrocellulose pendant 2 heures à 200 mA. Révélation avec les anti-AT ou les anti-2C11 (quand spécifié) dilués au 1/10 000, 2nd AC couplé à la peroxydase au 1/10 000. Substrat de la peroxydase: luminol (kit Amersham). Masses moléculaires de référence (en kDalton). L'emplacement du CYP2C11 est indiquée par une flèche.

III-2-3 Sur microsomes de rats induits au phénobarbital

La figure III-3 montre les immunotransferts d'incubations d'AT en présence de microsomes de rat traités au phénobarbital (1 μ M P450, 100 μ M AT, 30 minutes à 37°C, protocole décrit p. 137) en absence ou en présence de 1 mM de NADPH et/ou de 5 mM de GSH. En présence de NADPH, une importante fixation covalente aux protéines microsomales est détectée. En particulier, une bande correspondant à un adduit qui possède une masse moléculaire proche de 50 kD est fortement reconnue par les anti-AT. En présence de GSH et de NADPH, les métabolites de l'AT se fixent principalement sur la protéine de 50 kD. Néanmoins un autre adduit de 48 kD est également détecté par les anti-AT mais avec une intensité beaucoup plus faible. L'adduit de 50 kD ne correspond pas au CYP2C11 ni au CYP2B1 ou CYP2B2 comme le montre l'utilisation des anticorps spécifiques de ces isoformes.

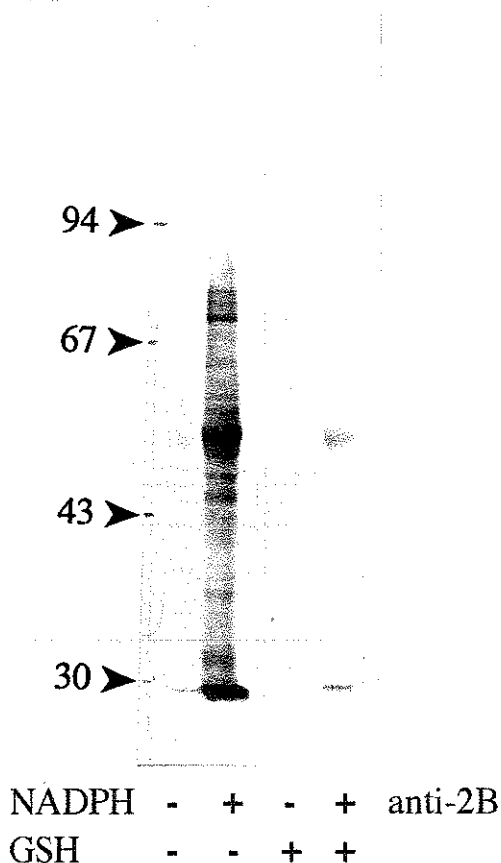


Figure III-3. Immunotransferts d'incubations d'AT en présence de microsomes de rats traités au phénobarbital suivant différentes conditions (\pm NADPH et GSH). Incubations 1 μ M P450, 100 μ M AT, \pm 1 mM NADPH et \pm 5 mM GSH, 30 minutes à 37°C. Extraction de l'AT libre et séparation des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur gel à 9% en polyacrylamide avec des dépôts de 15 μ g/puits. Transfert sur nitrocellulose pendant 2 heures à 200 mA. Révélation avec les anti-AT ou les anti-2B (quand spécifié) dilués au 1/10 000, 2nd AC couplé à la peroxydase au 1/10 000. Substrat de la peroxydase: luminol (kit Amersham). Masses moléculaires de référence (en kDalton).

III-2-4 Conclusion

1	2C9	MDPVVVLVLCLSCLLLLSLWRQSSGRGKLP PGP TPLP VIGNILQIGIKDI	50
2	2C11	MDPVLVVLVLTLSLLLSLWRQSFGRGKLP PGP TPLP IIGNTLQIYMKDI	50
3	2C6	MDLVMLVLTCLILLSIWRQSSGRGKLP PGP IPLP IIGNIFQLNVKNI	50
1		SKSLTNLSKVYGPVFTLYFGLKPIVVLHGYEAVKEALIDLGEFFSGRGIF	100
2		QOSIKKFSKVYGPIFTLYLGMKPFVVLHGYEAVKEALVDLGEFFSGRGSF	100
3		TQSLTSEFSKVYGPVFTLYFGTKPIVILHGYEAVKEALIDHGEEFAERGSF	100
1		PLAERANRGGFIVFSNGKWKKEIRRFSLMTLRNF GMGKR SIEDRVQEEAR	150
2		PVSE R VNKGLGVIFSN G M Q WKKEIRRF S IMTLR T F G M G KRTIEDRIQEEAQ	150
3		PVAEKINKDLGIVFSHG N RWKEIRRF T LITLRLN L GM G KRNIEDRVQEEAR	150
1		CLVEELRRTKASPCDPTFILGCAPCNVICSIIFHKRFDYKDQDFLNLMEK	200
2		CLVEELRKS K GAPFDPTFILGCAPCNVICSIIFQNRFDYKDPTFLNLMHR	200
3		CLVEELRKTNGSPCDPTFILGCAPCNVICSIIFQNRFDYKDQDFLNLMEK	200
1		LNENIKILSSPWIQICNNFSPTIDYFPGTHNKLK N VAFM K SYILEKVKE	250
2		FNENFR L SSPW L QVCN F PAIIDYFPGSH N QVLK N FFYIK N VLEKVKE	250
3		LNENMKILSSPWTQFC S FPVLIDYCPGSH T TLAK N VYHIRNYLLK K IKE	250
1		HQESMDMNNPQDFIDCF L M K MEKEKH N Q P SEFTIESLENTAVDLFGAGTE	300
2		HQESLDKDNPRDFIDCF L N K MEQEKH N Q P SEFTLES L VATV T DMFGAGTE	300
3		HQESLDVTNPRDFIDY L LK W QENHN P HSEFTLE N L S ITV T DLFGAGTE	300
1		TTSTTLRYALLLLLKHPEVTAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRSHMPYTDA	350
2		TTSTTLRYGLLLLKHVDVTAKVQEEIERVIGRNRSPCMKDRSOMPYTDA	350
3		TTSTTLRYALLLLLKCPEVTAKVQEEIDRVV G KHRSPCMQDRSRMPYTDA	350
1		VHEVQRCIDL L PTSLPHAVTCDIKFRNYLIPKGT T LILSLTSVLHDNKE	400
2		VHEIQRYIDL V PTNLPHL V TRDIKFRNYFI P KGT N VIVSLSSILHDDKE	400
3		HDHEVQRFIDL I PTNLPHAVTCDIKFRNYLIPKGT T ITSLSSVLHDSKE	400
1		FPNPEMFDPHHFLDEGDNFKKSKYFMPFSAGKRICVGEALAGMELFLFLT	450
2		FPNPEKFDPGHFLDERGNFKKSDYFMPFSAGKRICAGEALARTEFLFFT	450
3		FPDPEIFDPGHFLDGN G FKKSDYFMPFSAGK R MCAGEGLARMELFLFLT	450
1		SILQNFNLKSLVDPKNLD T TPVNGFASVPPFYQLCFIPV	490
2		TILQNFNLKSLVDVKDID T TPAISGFHLPFFYEACFIPV	490
3		TILQNFKLKSVLHPKDID T TPVNGFASLPPFYELCFIPL	490

Figure III-4. Alignement de séquence en acides aminés des protéines CYP2C9 et CYP2C11 et CYP2C6. Les acides aminés identiques dans les trois séquences sont indiqués en gras. La cystéine 435 (site de fixation de l'hème) est soulignée. En rouge : acides aminés identiques entre les CYP2C9 et 2C11 mais différents du CYP2C6. En bleu : acides aminés identiques entre les CYP2C9 et 2C6 mais différents du CYP2C11.

Abréviation à 3 lettres des acides aminés :

- à chaînes latérales non polaires: A: Ala; F: Phe; I: Ile; L: Leu; M: Met; P: Pro; V: Val; W: Trp.
- à chaînes latérales non chargées: C: Cys; G: Gly; N: Asn; Q: Gln; S: Ser; T: Thr; Y: Tyr.
- à chaînes latérales basiques: H: His; K: Lys; R: Arg.
- à chaînes latérales acides: D: Asp; E: Glu.

La fixation covalente de l'AT sur les microsomes de rats diffère de celle déterminée chez l'homme. En particulier chez le rat, en absence de GSH, les métabolites réactifs de l'AT se fixent de façon apparemment non sélective sur de très nombreuses protéines microsomales. Ainsi, les profils d'alkylation obtenus avec l'AT chez le rat ressemblent à ceux déterminés pour l'IAT chez l'homme. Cependant, l'ajout de GSH dans le milieu d'incubation permet de mettre en évidence une sélectivité de la fixation covalente de l'AT sur les protéines microsomales de tous les types de rat étudiés. En effet, une alkylation spécifique du CYP2C11 est observée chez les rats contrôles et ceux traités au clofibrate. Cette isoforme constitue le principal P450 hépatique chez le rat contrôle mâle. Cette isoforme est exprimée de façon constitutive et est considérée comme l'homologue du CYP2C9 humain en raison de la forte identité de leur séquences protéiques (77%) (figure III-4). La protéine spécifiquement alkylée dans les microsomes de rats traités au phénobarbital n'est pas le CYP2C11. En effet, l'adduit principal observé en présence de GSH dans le milieu d'incubation ne comigre pas avec cette isoforme. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le CYP2C11 est fortement réprimé par le traitement des rats au phénobarbital. Ce P450 n'est donc probablement pas celui qui prend en charge l'AT chez le rat traité au phénobarbital. Les isoformes de P450 les plus fortement induites par le phénobarbital sont les CYP2B1/2B2. Cependant, l'adduit principal ne comigre pas non plus avec ces deux P450. Ce résultat corréle ceux d'Elisabeth Neau (Neau, 1989) qui avait montré que les CYP2B1 et CYP2B2 purifiés et reconstitués ne sont pas capables de métaboliser l'AT. Par contre, elle avait déterminé que le CYP2C6 est principalement responsable de la prise en charge de l'AT chez les rats traités avec le phénobarbital. Le CYP2C6 est induit par le phénobarbital et présente une identité de séquence de 75.5% avec le CYP2C9 (figure III-4) En effet, l'hydroxylation de l'AT réalisée par des microsomes de rats traités au phénobarbital est inhibée à 70% par l'ajout d'anti-CYP2C6 dans le milieu d'incubation. De plus, le CYP2C6 reconstitué est capable de métaboliser l'AT (Neau, 1989). Il est donc probable que l'adduit identifié chez les rats traités au phénobarbital dans notre étude corresponde au CYP2C6 alkylé.

Il est par conséquent intéressant de noter que les cibles des métabolites de l'AT sont précisément des enzymes impliquées dans l'activation du médicament. Ce sont ces mêmes P450 qui constituent les cibles principales d'alkylation de l'AT chez le rat contrôle et le rat traité au phénobarbital. La répression du CYP2C11 par le traitement au phénobarbital explique très probablement le fait que cette isoforme ne soit pas alkylée chez les rats traités par cet inducteur. Les résultats obtenus chez le rat contrôle sont les plus proches de ceux déterminés chez l'homme. En effet, le CYP2C11 constitue le P450 majoritaire chez le rat mâle non induit et représente également l'homologue du CYP2C9 humain. Cette similitude entre les P450 de ces deux espèces est très vraisemblablement à l'origine des résultats très proches obtenus chez l'homme et chez le rat. Ainsi, nous avons montré que :

Résultats

- le métabolisme oxydatif responsable de la fixation covalente est le même (section I et Valadon, 1992),

- les anti-LKM₂, spécifiques du CYP2C9 humain mais qui croisent avec le CYP2C11, inhibent ce métabolisme oxydatif (section I-5),

- les profils d'alkylation obtenus *in vitro* en présence d'un piègeur nucléophile présentent la même spécificité (sections II-4-3 et III-2-1),

- la cible d'alkylation est le P450 responsable du métabolisme oxydatif de l'AT chez l'homme ou le rat (sections II-4-3 et III-2-1).

Ces similitudes laissent présager qu'une étude de la fixation covalente de l'AT *in vivo* chez le rat fournirait des données importantes pour comprendre les mécanismes de toxicité rencontrés chez l'homme.

III-3 Cinétique de la fixation covalente de l'AT *in vivo*

Nous avons mené cette étude sur le rat contrôle car les profils d'alkylation se rapprochent de ceux obtenus chez l'homme; à savoir une fixation covalente de l'AT focalisée sur le CYP2C11 et le CYP2C9 respectivement. De plus, nous avons également utilisé des rats préalablement traités au phénobarbital pour comparaison. Plus précisément, nous avons étudié la cinétique d'alkylation des protéines hépatiques par l'AT au cours du temps. Pour cela, le protocole suivant a été retenu :

- 1) injection (ip) d'une dose unique d'AT (100 mg/kilo) à des rats Sprague Dawley de 200 g,
- 2) sacrifice à différents temps (0; 2; 4; 6; 10; 24 et 48 heures),
- 3) préparation des fractions hépatiques (microsomes et cytosols),
- 4) extraction de l'AT libre par différents solvants organiques,
- 5) dissolution des protéines par le SDS 1%,
- 6) séparation de ces protéines par électrophorèse,
- 7) réalisation d'immunotransferts avec des anticorps spécifiques.

Le tableau III-2 regroupe les données relatives aux rats et aux fractions obtenus à partir de ces animaux. Le rat PB4 est retiré de l'étude car son foie est atypique. Ce rat était probablement malade.

Tableau III-2. Caractéristiques des fractions hépatiques obtenues à partir de foies de rats traité avec une dose unique d'AT (100 mg/kilo) et sacrifiés à différents temps.

rat	poids du foie (g)	P450 microsomal (nmole/mL)	b5 microsomal (nmole/mL)	protéines microsomales (mg/mL)	protéines cytosoliques (mg/mL)
C0	13.33	22.55	19.20	22.8	15.2
C2	11.40	15.39	14.75	17.7	14.0
C4	13.31	14.81	16.46	18.6	16.0
C6	12.65	17.35	21.12	19.8	14.0
C10	11.91	16.94	20.80	20.1	14.8
C24	15.25	16.04	18.20	17.4	15.2
C48	16.33	12.62	16.55	18.9	16.4
P0	14.99	54.50	31.00	29.2	17.2
P2	19.29	46.24	23.48	26.4	21.6
P4	7.90	31.29	32.37	26.0	11.6
P6	14.86	75.96	28.70	33.2	16.8
P10	17.35	78.41	46.85	33.6	15.2
P24	15.25	37.70	27.50	27.2	18.0
P48	15.72	43.84	25.02	27.2	16.8

Cx : rat contrôle; Px : rat préalablement traité au phénobarbital
x correspond à l'intervalle de temps (en heures) entre l'injection d'AT et le sacrifice de l'animal.

Nous avons utilisé les anti-AT afin de déterminer la cinétique d'apparition des adduits de l'AT sur les fractions hépatiques des rats contrôles et des rats traités au phénobarbital.

III-3-1 Sur microsomes de rats contrôles et de rats traités au phénobarbital

Rats contrôles

La figure III-5 montre qu'aucune protéine microsomale n'est alkylée lorsque l'animal n'a pas subi d'injection d'AT (C0). Par contre dès la deuxième heure après le traitement à l'AT, de nombreux adduits sont détectables. Ces adduits sont observables au moins jusqu'à 10 heures après l'injection d'AT (C10). Par contre, ils disparaissent à partir de 24 heures après traitement (C24 et C48). Parmi les protéines alkylées, un adduit de masse moléculaire de 52 kD semble prédominer. Cet adduit correspond à une protéine abondante dans les microsomes des rats contrôles. La figure III-6 présente une corrélation de la membrane de nitrocellulose présentée sur la figure III-5 avec les anti-CYP2C11. Les protéines révélées correspondent donc d'une part aux adduits de l'AT et au CYP2C11 d'autre part. Les dépôts protéiques correspondants aux rats C0, C24 et C48 permettent de localiser le CYP2C11 car aucun adduit n'avait été détecté pour ces rats sur la figure III-5. Cette corrélation permet de montrer que l'adduit principal de 52 kD détecté chez les rats C2, C4, C6 et C10 comigre avec le CYP2C11. Par conséquent, le CYP2C11 constitue une cible d'alkylation privilégiée de l'AT *in vivo* chez le rat contrôle.

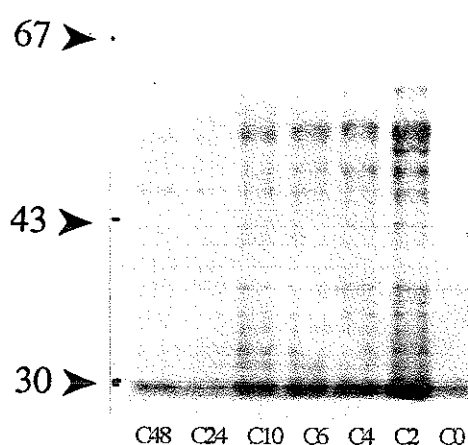


Figure III-5. Immunotransfert de microsomes de rats contrôles traités avec l'AT et sacrifiés à différents temps. Les rats sont traités avec une injection (ip) unique d'AT 100 mg/kilo et sont ensuite sacrifiés au bout de 2, 4, 6, 10, 24 et 48 heures (rats C2, C4, C6, C10, C24, C48). Le témoin (C0) est sacrifié au temps 0. Les microsomes sont préparés, l'AT libre extrait et les protéines séparées (gel à 9%, SDS-PAGE, 15 µg/puits). Transfert sur nitrocellulose. Révélation au luminol avec les anti-AT et le 2nd AC au 1/10 000. Masses moléculaires de référence (en kDalton).

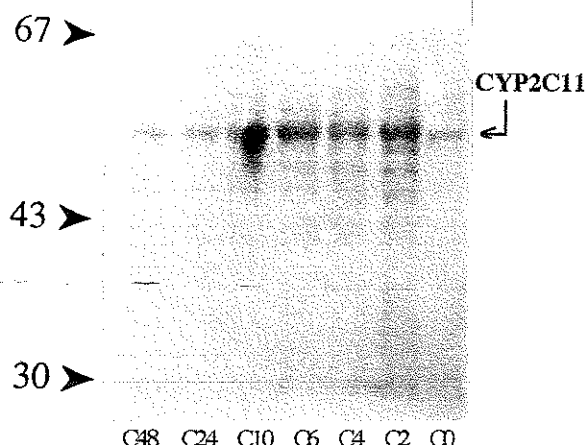


Figure III-6. Corrélation de l'immunotransfert de la figure III-5 avec les anti-2C11. La membrane de nitrocellulose utilisée dans la figure III-5 est incubée avec les anti-2C11 dilués au 1/10 000. Le 2nd AC couplé à la peroxydase dilué au 1/10 000 est ensuite ajouté. Les anti-AT restés sur l'immunotransfert ainsi que les anti-2C11 sont révélés en même temps avec le luminol (kit Amersham). Masses moléculaires de référence (en kDalton). L'emplacement du CYP2C11 est indiqué par une flèche.

Rats traités au phénobarbital

La figure III-7 montre la cinétique d'apparition des adduits de l'AT sur les protéines microsomales de rats préalablement traités au phénobarbital. En absence de traitement avec l'AT, aucun adduit n'est détecté, ceci montre la spécificité des anti-AT et permet de s'assurer qu'aucune protéine non alkylée n'est reconnue par les anticorps. Des adduits sont détectés dès 2 heures après traitement avec l'AT. Ces derniers sont peu nombreux, relativement spécifiques et détectables jusqu'à au moins 10 heures après l'injection d'AT. Un seul adduit persiste jusqu'à 48 heures. Il correspond à une protéine de masse moléculaire de 48 kD. Néanmoins, l'intensité de l'alkylation de cette protéine décroît au cours du temps. Parmi les rares protéines alkylées, entre 2 et 10 heures, un adduit qui présente une masse moléculaire de 50 kD semble prédominer. La figure III-8 présente une corrélation de la feuille de nitrocellulose de la figure III-7 avec les anti-CYP2C11. Les protéines détectées correspondent donc aux adduits de l'AT d'une part et au CYP2C11 d'autre part. Le CYP2C11, la seule protéine révélée chez les rats P24 et P48 montre que ce P450 ne comigre pas avec l'adduit principal de 50 kD. L'adduit de 50 kD ne comigre pas non plus avec les CYP2B1/2B2.

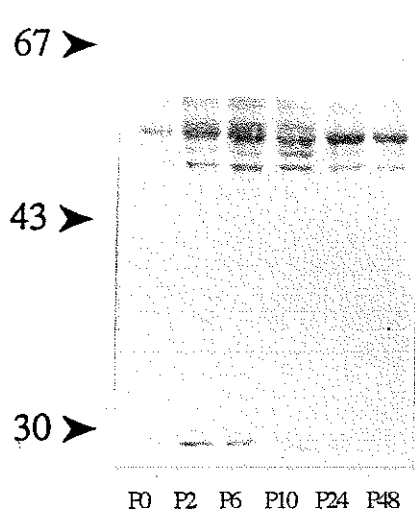


Figure III-7. Immunotransfert de microsomes de rats traités au phénobarbital puis avec l'AT et sacrifiés à différents temps. Les rats traités au phénobarbital reçoivent une injection (ip) unique d'AT 100 mg/kilo et sont ensuite sacrifiés au bout de 2, 6, 10, 24 et 48 heures (rats P2, P6, P10, P24, P48). Le témoin (P0) est sacrifié au temps 0. Les microsomes sont préparés, l'AT libre extrait et les protéines séparées (gel à 9%, SDS-PAGE, 15 µg/puits). Transfert sur nitrocellulose. Révélation au luminol avec les anti-AT et le 2nd AC au 1/10 000. Masses moléculaires de référence (en kDalton).

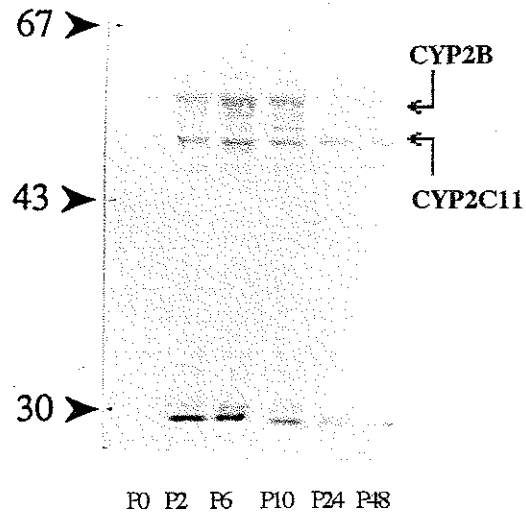


Figure III-8. Corrélation de l'immunotransfert de la figure III-7 avec les anti-2C11. La membrane de nitrocellulose utilisée dans la figure III-7 est incubée avec les anti-2C11 dilués au 1/10 000. Le 2nd AC couplé à la peroxydase dilué au 1/10 000 est ensuite ajouté. Les anti-AT restés sur l'immunotransfert ainsi que les anti-2C11 sont révélés en même temps avec le luminol (kit Amersham). Masses moléculaires de référence (en kDalton). L'emplacement des CYP2C11 et CYP2B1/2B2 (CYP2B) est indiqué par une flèche.

III-3-2 Sur cytosols de rats contrôles et de rats traités au phénobarbital

La figure III-9 montre la révélation des adduits de l'AT sur les protéines cytosoliques des rats contrôles. L'alkylation présente un maximum d'intensité 2 heures après le traitement à l'AT comme pour les protéines microsomales. Par contre, la cinétique d'alkylation obtenue diffère légèrement de celle déterminée sur les protéines microsomales car certains adduits sont encore détectables 48 heures après le traitement par l'AT. En particulier, deux adduits présentant des masses moléculaires de 40 et 45 kD constituent les cibles majoritaires de l'AT détectés jusqu'à 48 heures. La figure III-10 montre qu'aucune protéine cytosolique de rats traités au phénobarbital n'est alkylée par l'AT dans les conditions de l'étude. Ce résultat contraste avec celui obtenu chez le rat contrôle mais corrèle la faible quantité d'adduits détectée par les anti-AT dans les microsomes des rats traités au phénobarbital.

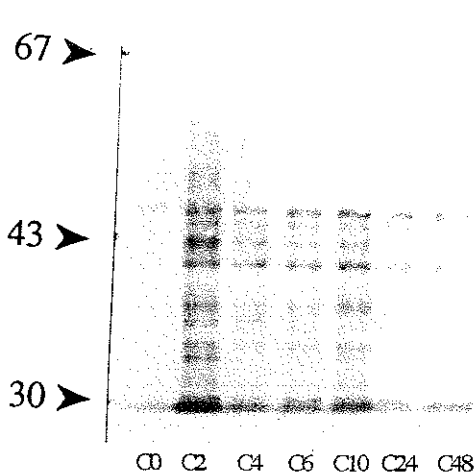


Figure III-9. Immunotransfert de cytosols de rats contrôles traités avec l'AT et sacrifiés à différents temps. Les rats sont traités avec une injection (ip) unique d'AT 100 mg/kilo et sont ensuite sacrifiés au bout de 2, 4, 6, 10, 24 et 48 heures (rats C2, C4, C6, C10, C24, C48). Le témoin (C0) est sacrifié au temps 0. Les cytosols sont préparés, l'AT libre extrait et les protéines séparées (gel à 9%, SDS-PAGE, 15 µg/puits). Transfert sur nitrocellulose. Révélation au luminol avec les anti-AT et le 2nd AC au 1/10 000. Masses moléculaires de référence (en kDalton).

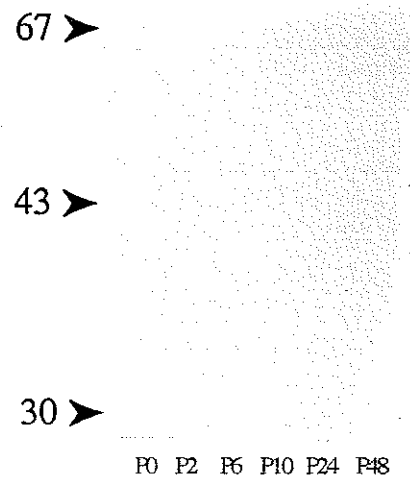


Figure III-10. Immunotransfert de cytosols de rats traités au phénobarbital puis avec l'AT et sacrifiés à différents temps. Les rats traités au phénobarbital reçoivent une injection (ip) unique d'AT 100 mg/kilo et sont ensuite sacrifiés au bout de 2, 6, 10, 24 et 48 heures (rats P2, P6, P10, P24, P48). Le témoin (P0) est sacrifié au temps 0. Les cytosols sont préparés, l'AT libre extrait et les protéines séparées (gel à 9%, SDS-PAGE, 15 µg/puits). Transfert sur nitrocellulose. Révélation au luminol avec les anti-AT et le 2nd AC au 1/10 000. Masses moléculaires de référence (en kDalton).

III-3-3 Influence de l'alkylation du CYP2C11 *in vivo* sur son activité chez le rat contrôle

Nous avons tenté d'étudier l'influence de l'alkylation du CYP2C11 par l'AT sur l'activité de ce P450 chez le rat contrôle. Pour cela, nous avons utilisé une activité associée au CYP2C11 : l'activation de l'AT et plus précisément la mesure de la fixation covalente sur les protéines liée à cette activation. Pour cela, nous avons incubé de l'AT radiomarqué en présence des microsomes des rats traités *in vivo* avec l'AT froid et mesuré la fixation covalente des métabolites de l'AT radiomarqué sur les protéines microsomales. Les résultats de cette étude sont regroupés sur le tableau III-3. Les résultats contenus dans ce tableau semblent montrer que le traitement *in vivo* avec l'AT entraîne une baisse partielle de l'activité du CYP2C11. Cette baisse semble assez bien corrélée que l'on raisonne en terme de contenu en P450 ou en terme de concentration de protéines. La perte d'activité du CYP2C11 passe par un maximum (- 33.3% par rapport au témoin non traité) 4 heures après le traitement *in vivo* avec l'AT et diminue ensuite progressivement. Au bout de 6 à 10 heures, l'activité du CYP2C11 retrouve sa valeur de référence. Une augmentation sensible (+15%) de l'activité du CYP2C11 est notée 24 heures après traitement *in vivo* avec l'AT lorsque l'on se réfère au contenu en P450. L'activité du CYP2C11 chez le rat sacrifié 48 heures après traitement avec l'AT retrouve une valeur normale. Il faut cependant noter qu'un tel effet rebond n'est plus du tout évident si l'on se réfère cette fois-ci à la concentration en protéines.

Tableau III-3. Fixation covalente de l'AT radiomarqué catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités *in vivo* avec de l'AT froid.

Rat	Fixation covalente (nmole AT/nmole P450)	Pourcentage Cx/CO	Fixation covalente (nmole AT/mg protéines)	Pourcentage Cx/CO
C0	3.65 ± 0.17	100	3.61	100
C2	2.89 ± 0.03	79.2	2.51	69.5
C4	2.43 ± 0.04	66.6	1.93	28.8
C6	3.53 ± 0.19	96.7	3.09	85.5
C10	3.92 ± 0.06	107.4	3.30	91.4
C24	4.20 ± 0.08	115.0	3.87	107.2
C48	3.81 ± 0.09	104.4	2.54	70.4

Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 déterminations ± la déviation standard.
Cx : rat contrôle sacrifié au temps x après traitement *in vivo* avec l'AT.

III-3-4 Sur coupes de foie de rats contrôles

Nous avons également testé la capacité des anti-AT à détecter des adduits protéiques directement *in situ* sur des coupes de foie de rats traités *in vivo* avec de l'AT. Pour cela, nous avons utilisé un protocole (détaillé p. 142) qui se décompose en plusieurs étapes :

- 1) réalisation de prélèvements sur les foies congelés des rats traités avec l'AT,
- 2) coupe à congélation de 10 μm au cryostat à partir de ces prélèvements,
- 3) transfert des coupes réalisées sur lames de verre gélatinées,
- 4) fixation des tissus hépatiques par le formol,
- 5) blocage des sites d'absorption par de la SAB, de la gélatine et du serum de chèvre,
- 6) incubation avec les anti-AT dilués au 1/500,
- 7) incubation avec le 2nd anticorps couplé à la peroxydase,
- 8) révélation de l'activité peroxydasique,
- 9) après l'arrêt de la réaction, inclusion dans une résine histologique,
- 10) observation au microscope relié à une caméra numérique pour acquisition informatique.

Au minimum trois coupes de foie du même rat sont transférées sur chaque lame. Les observations microscopiques faites sur une coupe peuvent ainsi être confirmées par observation des deux ou trois autres. Le premier et le second anticorps sont dilués dans la solution de blocage. Des lavages sont réalisés entre chaque étape de l'immunorévélation. Nous n'avons pas eu recours au traitement préalable des coupes à l'eau oxygénée pour éviter l'activité peroxydasique endogène. En effet, le bruit de fond de la réaction immunologique était négligeable.

La figure III-11 présente des immunorévélations réalisées avec les anti-AT sur les coupes de foie des rats contrôles traités *in vivo* avec l'AT puis sacrifiés à différents temps. Il s'agit de photographies numériques tirées à partir d'observations microscopiques réalisées au grossissement x100. Chaque photographie est centrée sur une veine centrolobulaire représentative de l'ensemble de celles observables sur les trois ou quatre coupes réalisées pour un même rat. Aucune coloration caractéristique de l'AT n'est décelable sur la coupe du rat témoin (C0). Par contre, dès 2 heures après le traitement avec l'AT, la fixation du médicament sur les protéines est observable et semble principalement concerner le contour des veines centrolobulaires (rat C2). L'alkylation préférentielle des cellules qui bordent les veines centrolobulaires est confirmée sur les coupes du rat C4. En effet, nous observons une coloration plus marquée au bout de 4 heures sur l'ensemble de la coupe et plus spécifiquement au niveau des hépatocytes centrolobulaires. Au temps 6 heures, l'alkylation de l'AT progresse et atteint des couches de cellules plus profondes. A 10 heures après le traitement avec l'AT, l'intensité de l'alkylation décroît sur l'ensemble de la coupe. Néanmoins la fixation covalente de l'AT persiste au niveau des veines centrolobulaires autour desquelles elle se présente en gradient. En effet, plus les cellules sont éloignées des veines centrolobulaires et plus faible est

Résultats

leur alkylation par l'AT. Sur les coupes des rats sacrifiés au bout de 24 et 48 heures (rats C24 et C48), la fixation de l'AT n'est plus détectable par les anti-AT.

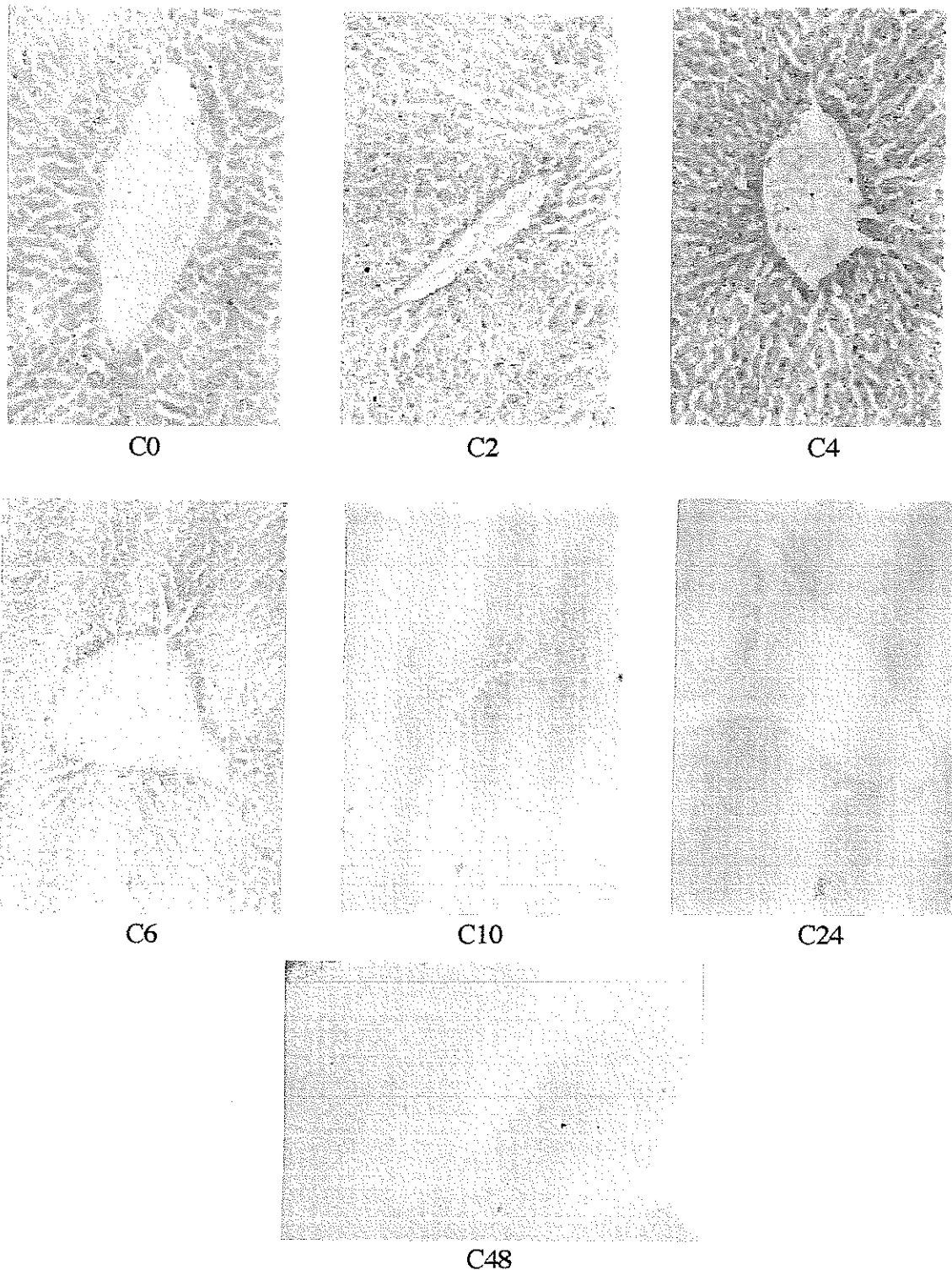


Figure III-11. Révélation immunochimique des adduits covalents de l'AT *in situ* sur coupes de foie de rat contrôlé traité avec l'AT et sacrifié à différents temps. Les rats sont traités avec une dose unique d'AT (100 mg/kilo) et sacrifiés aux temps 0, 2, 4, 6, 10, 24 et 48 heures (rats C0, C2, C4, C6, C10, C24 et C48). Réalisation de coupes de foies de 10 μ m au cryostat, fixation des tissus au formol et révélation des adduits avec les anti-AT au 1/500. 2nd AC couplé à la peroxydase (kit Vectastain), substrat : diaminobenzidine. Observation microscopique grossissement x100.

Résultats

La progression de la fixation covalente de l'AT est très visible sur des grossissements x400 présentés sur les pages suivantes. Ainsi les figures III-12, III-13, III-14, III-15 présentent respectivement des immunorévélations avec les anti-AT réalisées sur les cellules qui bordent les veines centrolobulaires des rats C0, C2, C4 et C6.

Figure III-12. Révélation immuno-chimique des adduits covalents de l'AT *in situ* sur coupes de foie de rat contrôle traité avec l'AT et sacrifié au temps 0. Le rat est traité avec une dose unique d'AT (100 mg/kilo) et sacrifié immédiatement. Réalisation de coupes de foies de 10 μ m au cryostat, fixation des tissus au formol et révélation des adduits avec les anti-AT au 1/500. 2nd AC couplé à la peroxydase (kit Vectastain), substrat : diaminobenzidine. Observation microscopique grossissement x400.

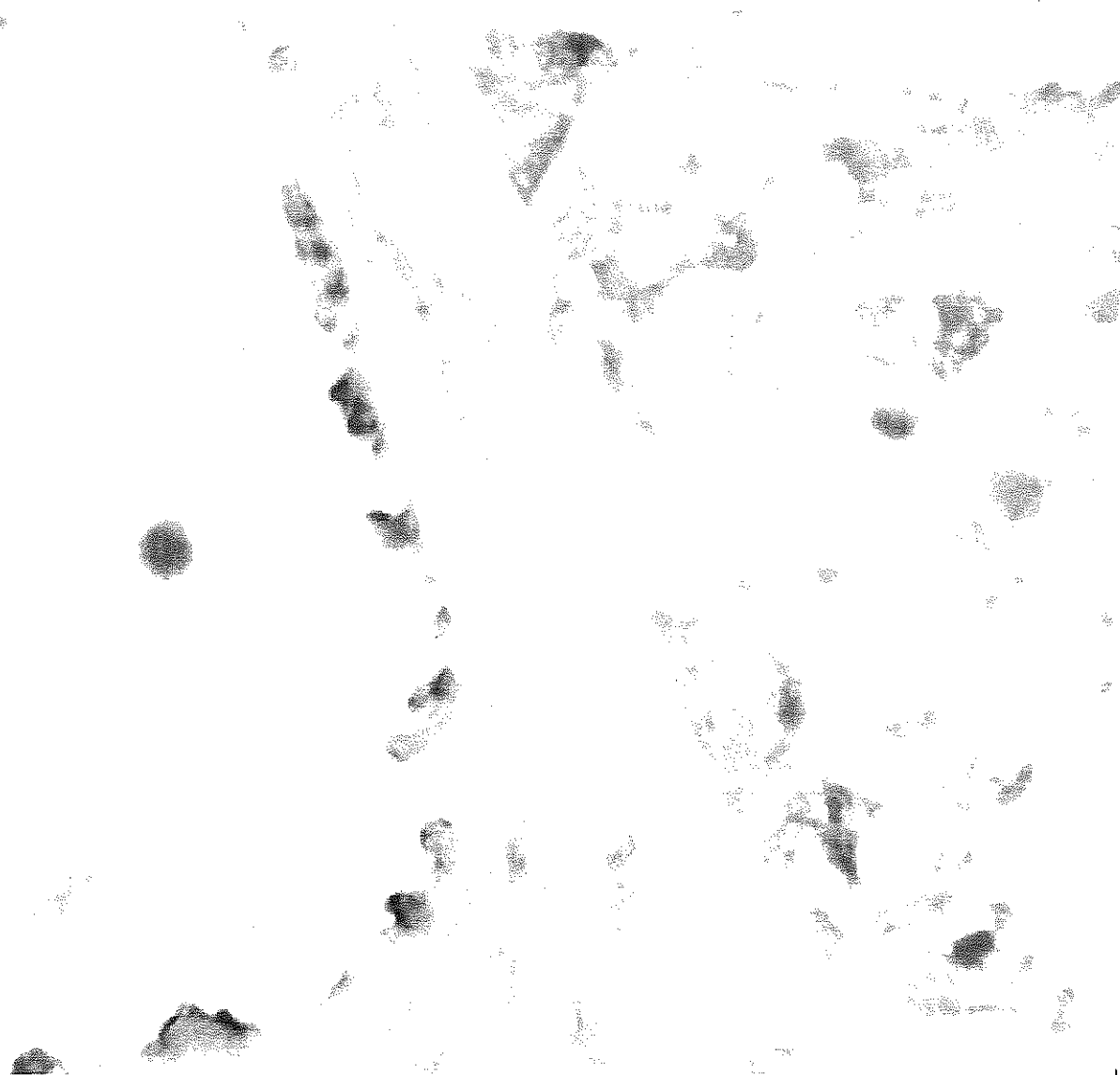


Figure III-13. Révélation immuno-chimique des adduits covalents de l'AT *in situ* sur coupes de foie de rat contrôle traité avec l'AT et sacrifié au temps 2 heures. Le rat est traité avec une dose unique d'AT (100 mg/kilo) et sacrifié 2 heures après. Réalisation de coupes de foies de 10 μm au cryostat, fixation des tissus au formol et révélation des adduits avec les anti-AT au 1/500. 2nd AC couplé à la peroxydase (kit Vectastain), substrat : diaminobenzidine. Observation microscopique grossissement x400.



Figure III-13. Révélation immuno-chimique des adduits covalents de l'AT *in situ* sur coupes de foie de rat contrôle traité avec l'AT et sacrifié au temps 4 heures. Le rat est traité avec une dose unique d'AT (100 mg/kilo) et sacrifié 4 heures après. Réalisation de coupes de foies de 10 μ m au cryostat, fixation des tissus au formol et révélation des adduits avec les anti-AT au 1/500. 2nd AC couplé à la peroxydase (kit Vectastain), substrat : diaminobenzidine. Observation microscopique grossissements x400.

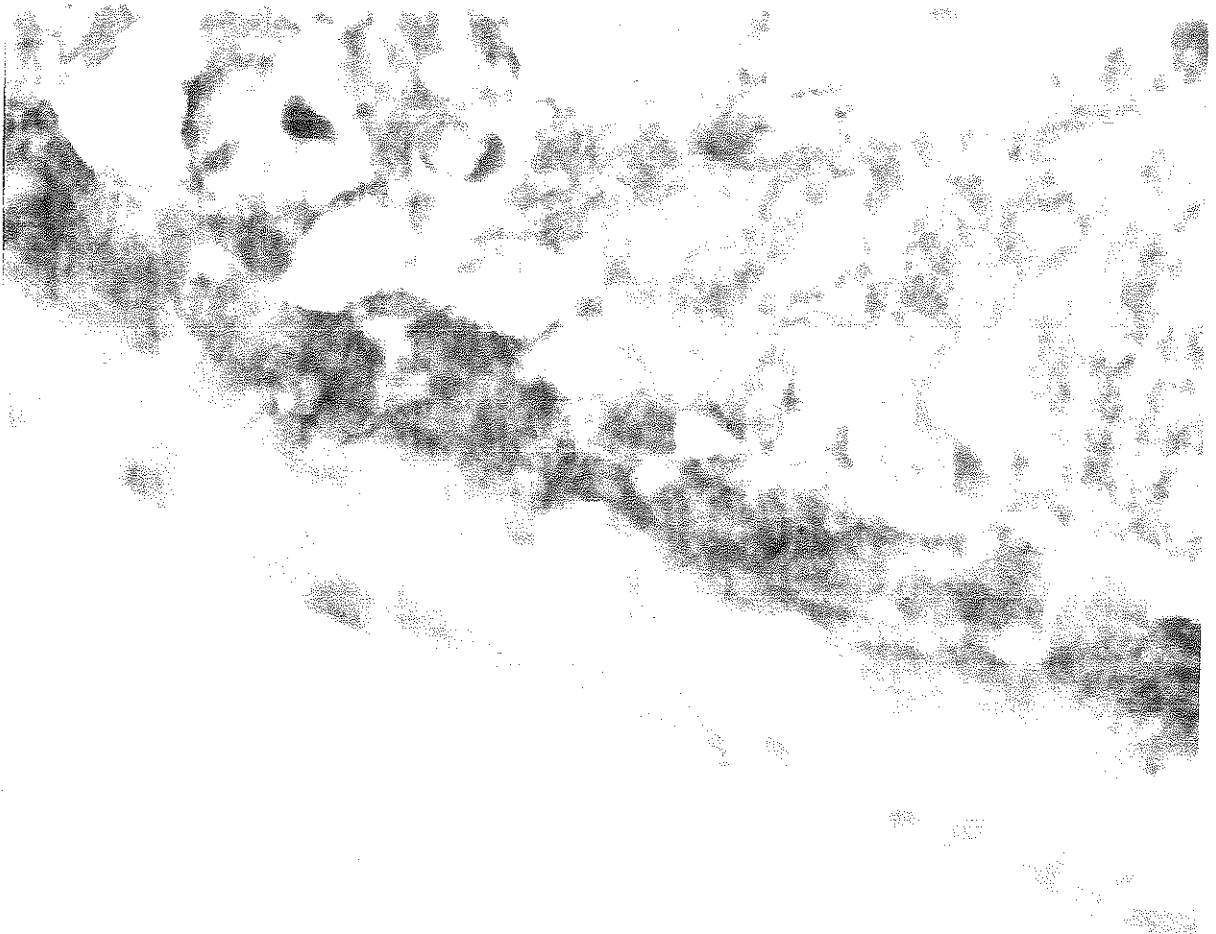


Figure III-14. Révélation immunochimique des adduits covalents de l'AT *in situ* sur coupes de foie de rat contrôle traité avec l'AT et sacrifié au temps 6 heures. Le rat est traité avec une dose unique d'AT (100 mg/kilo) et sacrifié 6 heures après. Réalisation de coupes de foies de 10 μm au cryostat, fixation des tissus au formol et révélation des adduits avec les anti-AT au 1/500. 2nd AC couplé à la peroxydase (kit Vectastain), substrat : diaminobenzidine. Observation microscopique grossissements x400.

III-3-5 Conclusion

L'injection d'une dose unique d'AT à des rats contrôles ou des rats préalablement traités au phénobarbital entraîne l'apparition d'adduits covalents sur les protéines hépatiques de ces rats. La fixation covalente de l'AT sur les microsomes de rats contrôles est observable dès 2 heures après le traitement avec l'AT. L'intensité de cette fixation covalente semble maximale entre 2 et 4 heures. Ce résultat corrèle parfaitement des résultats obtenus avec l'AT radioactif (communication personnelle des Laboratoires Anphar Rolland). La fixation covalente reste visible jusqu'à 10 heures et ne l'est plus à 24 heures après traitement avec l'AT. Parmi les protéines alkylées, le CYP2C11 constitue une cible privilégiée. Ainsi, ce P450 qui constituait déjà une cible de l'AT *in vitro*, est également alkylé *in vivo*. Le groupe de Dominique Pessayre trouve des résultats identiques sur une cinétique de traitement de rats *in vivo* avec l'AT (Robin *et al.*, 1996). Cependant, il est important de noter que cette alkylation du CYP2C11 chez l'animal n'est pas aussi spécifique que celle déterminée *in vitro* en présence de glutathion. Ce résultat est surprenant car le contenu hépatique en glutathion est normalement relativement élevé (de l'ordre de quelques mM) et devrait permettre un piégeage efficace des métabolites réactifs de l'AT. Cette formation importante de métabolites est également à l'origine de nombreux adduits sur les protéines cytosoliques des mêmes rats. La cinétique de la fixation covalente de l'AT sur ces protéines solubles suit d'ailleurs celle observée au sein des microsomes. Marie-Anne Robin montre de plus que des adduits de l'AT sont également identifiables à la surface des hépatocytes des rats traités *in vivo* avec l'AT (Robin *et al.*, 1996). L'absence relative de sélectivité de la fixation covalente de l'AT *in vivo* observée chez le rat pourrait être à l'origine de différences fondamentales entre les réponses immunitaires induites chez l'homme et le rat. En effet, comme nous l'avons vu, la fixation covalente de l'AT chez l'homme présente une grande spécificité *in vitro* et ceci même en absence de glutathion. Il est donc fort probable que cette spécificité se retrouve également *in vivo*. Par opposition, chez le rat, il est peu vraisemblable qu'une réponse immunitaire soit spécifiquement dirigée contre le CYP2C11 en raison du nombre important de protéines alkylées.

La cinétique des adduits obtenus chez le rat préalablement traité au phénobarbital ressemble à celle déterminée chez le rat contrôle. Par contre, les profils d'alkylation diffèrent. En effet, les anti-AT ne révèlent que peu d'adduits au sein des microsomes des rats traités au phénobarbital. Par conséquent, aucune fixation covalente n'est détectable au niveau des cytosols de ces rats. La principale protéine alkylée par l'AT dans les microsomes de rats traités avec le phénobarbital n'est pas le CYP2C11 ni les CYP2B1 ou CYP2B2. Il s'agit très probablement de la même protéine spécifiquement alkylée *in vitro*, à savoir très probablement le CYP2C6. Le CYP2C6 purifié et reconstitué présente une activité beaucoup plus faible que celle du CYP2C11 vis à vis de l'AT (Neau, 1989). Cette différence d'activité et le rôle majeur du CYP2C6 dans le métabolisme de l'AT chez le rat traité au phénobarbital pourrait expliquer la plus faible proportion d'adduits formés chez ce type de rats.

Résultats

Il semble que l'alkylation du CYP2C11 par l'AT *in vivo* chez le rat contrôle entraîne une perte partielle de l'activité de cette enzyme. Cette inhibition est détectable à 2 et surtout 4 heures après traitement avec l'AT (33% d'inhibition de l'activité du CYP2C11 comparée à celle du témoin). Néanmoins, 6 et 10 heures après traitement avec l'AT, l'activité du CYP2C11 se situe à une valeur normale alors qu'il continue à être alkylé par l'AT. Une explication possible serait un turn-over rapide du CYP2C11 pour remplacer l'enzyme alkylée inactive. La proportion CYP2C11 alkylé/CYP2C11 total serait alors négligeable dès 6 heures. La quantité de CYP2C11 totale serait alors légèrement plus importante chez les rats sacrifiés 6 et 10 heures après traitement à l'AT.

L'observation de la formation d'adduits de l'AT sur coupes de foie de rats contrôles traités *in vivo* avec l'AT montre que fixation covalente du médicament se répartie sur l'ensemble de la coupe. Ce résultat est en accord avec la localisation ubiquitaire du CYP2C11 au sein des hépatocytes de rat (Pons, 1989). Néanmoins, la fixation covalente de l'AT se concentre également autour des veines centrolobulaires, lieu d'arrivée du médicament. Cette observation est cohérente, car les hépatocytes centrolobulaires sont soumis à des concentrations plus importantes du médicament. La fixation covalente localisée au niveau des veines centrolobulaires évolue au cours du temps. A 2 heures après traitement avec l'AT, seules les cellules les plus périphériques présentent des adduits de l'AT. A 4 heures, la fixation covalente touche un plus grand nombre de cellules et ces cellules sont de moins en moins périphériques. A 6 heures, les adduits touchent des couches de cellules plus profondes. Chez l'homme, une telle alkylation préférentiellement localisée au niveau des veines centrolobulaires pourrait favoriser les interactions entre les cellules immunocompétentes sanguines et les adduits de l'AT. Cette hypothèse impliquerait que les patients traités avec l'AT présentent probablement une sensibilisation vis à vis d'adduits de l'AT. La recherche d'une éventuelle sérologie anti-AT dans le serum des patient traités avec le diurétique fait donc l'objet de la partie suivante.

IV Recherche d'anticorps dirigés contre la fixation covalente de l'AT sur les protéines chez l'homme

IV-1 Motivations du travail

L'hépatite liée à la prise d'AT s'accompagne de l'apparition d'anticorps spécifiquement dirigés contre le CYP2C9 dans le serum des patients atteints (Poupon *et al.*, 1980 ; Homberg *et al.*, 1985). Ces anticorps, désignés anti-LKM₂, reconnaissent le CYP2C9 non alkylé par le médicament et n'existent pas chez les sujets non traités ou chez les patients traités avec l'AT mais n'ayant pas contracté l'hépatite (Beaune *et al.*, 1987 ; Lecoeur *et al.*, 1996). De plus, ils ne sont retrouvés dans aucun autre type d'hépatite médicamenteuse. Par conséquent, ils constituent un marqueur de l'hépatite induite par l'AT. Dans d'autres hépatites médicamenteuses immunoallergiques, les sera des patients atteints peuvent contenir des anticorps qui reconnaissent la fixation covalente du médicament sur certaines protéines. Ainsi, diverses situations peuvent se rencontrer : certains sera peuvent contenir soit des autoanticorps soit des anticorps dirigés contre la fixation du médicament sur les protéines tandis que d'autres contiennent des anticorps des deux types à la fois. Par exemple, dans le cas de l'hépatite à la dihydralazine, des autoanticorps dirigés contre le CYP1A2 natif sont détectés dans le sérum des patients atteints (Nataf *et al.*, 1986 ; Bourdi *et al.*, 1990). De même, dans l'hépatite liée à la prise d'iproniazide, des autoanticorps spécifiquement dirigés contre la MAO B sont présents dans les sera des sujets atteints (Pons *et al.*, 1996). A l'opposé, des anticorps qui reconnaissent l'érythromycine lié de façon covalente à des protéines ont été détectés chez un patient atteint d'une hépatite aiguë due à la prise de cet antibiotique (Gomez-Lechon *et al.*, 1996). De même, de nombreux patients atteints de l'hépatite sévère à l'halothane possèdent des anticorps qui reconnaissent l'anesthésique fixé sur des protéines (Kenna *et al.*, 1988). Il s'est avéré que certaines personnes reconnaissent également les formes natives de ces protéines alkylées par l'halothane (Martin *et al.*, 1990; 1993a,b). Ainsi, un même médicament peut induire l'apparition de plusieurs néoantigènes distincts. Comme nous l'avons montré dans les précédents chapitres, l'AT se fixe de façon covalente sur les protéines microsomales hépatiques humaines. Nous avons mis en évidence une alkylation spécifique du CYP2C9 et il est probable que la modification de cette protéine constitue une étape importante dans la génération d'anticorps dirigés contre elle. Les questions que nous nous sommes posés sont les suivantes : existe-t'il d'autres antigènes que le CYP2C9 reconnus par les anticorps contenus dans le serum des patients atteints de l'hépatite ? En particulier, ces personnes possèdent-elles des anticorps capables de reconnaître la fixation covalente de l'AT sur des protéines ? Si oui, existe-t'il une différence dans cette réponse entre les patients traités mais non atteints de l'hépatite et ceux qui sont en affectés ?

IV-2 Reconnaissance de la SAB-5S-AT par les sera humains

Nous avons testé la capacité de différents sera à reconnaître des protéines de référence modifiées par la fixation covalente de l'AT. La technique que nous avons retenu pour cette étude est l'ELISA. Nous avons initialement choisi de comparer les réponses des sera de patients traités par le médicament ou non (contrôles) vis à vis de la SAB-5S-AT et de la SAB non modifiée. Pour cela nous avons d'abord défini les meilleures conditions du test ELISA. Ainsi, nous avons déterminé les concentrations optimales d'antigènes (SAB-5S-AT et SAB) qui permettent d'obtenir le meilleur signal (reconnaissance de la SAB-5S-AT) pour le plus faible bruit de fond (reconnaissance de la SAB).

IV-2-1 Détermination de la quantité d'antigène idéale pour sensibiliser les puits des microplaques ELISA

Nous avons testé la réponse d'un serum contenant des anticorps anti-LKM₂ vis à vis des deux antigènes SAB-5S-AT et SAB non modifiée. Pour cela, les puits de microplaques ELISA ont été sensibilisés avec des quantités de SAB-5S-AT comprises entre 5.6 et 713 ng/puits (correspondant à une gamme de 1.25 à 160 pmoles d'AT/puits) ou avec les mêmes quantités de SAB. Le résultat de cet étalonnage du test ELISA est décrit sur la figure IV-1 qui montre que la SAB-5S-AT est mieux reconnue que la SAB non modifiée. La sensibilisation des puits par des quantités croissantes de SAB-5S-AT inférieures ou égales à 89.1 ng (20 pmoles d'AT) se traduit par une augmentation du signal. Au delà de cette quantité seuil de 89.1 ng/puits de SAB-5S-AT, la courbe tend vers un plateau à environ une unité d'absorbance. Parallèlement, la sensibilisation des puits par des quantités croissantes de SAB n'entraîne pas d'augmentation significative de l'absorbance. Cette dernière reste comprise entre 0.3 et 0.4 unités dans toute la gamme de SAB testée. Par conséquent, 89.1 ng de SAB-5S-AT soit 20 pmoles d'AT par puits constitue la quantité optimale pour sensibiliser les puits des microplaques ELISA.

IV-2-2 Réponse de différents patients traités avec l'AT vis à vis de la SAB-5S-AT et de la SAB non modifiée

Sur la figure IV-2 sont représentées les courbes de dilution de trois sera de patients traités avec l'AT. Parmi eux, le patient 1 a développé une hépatite induite par l'AT et son serum contient des anticorps anti-LKM₂. A l'inverse, les deux autres personnes ont été traités avec l'AT pendant plus d'un an mais n'ont pas contracté l'hépatite. Deux types d'antigènes sont testés : la SAB-5S-AT et la SAB non modifiée.

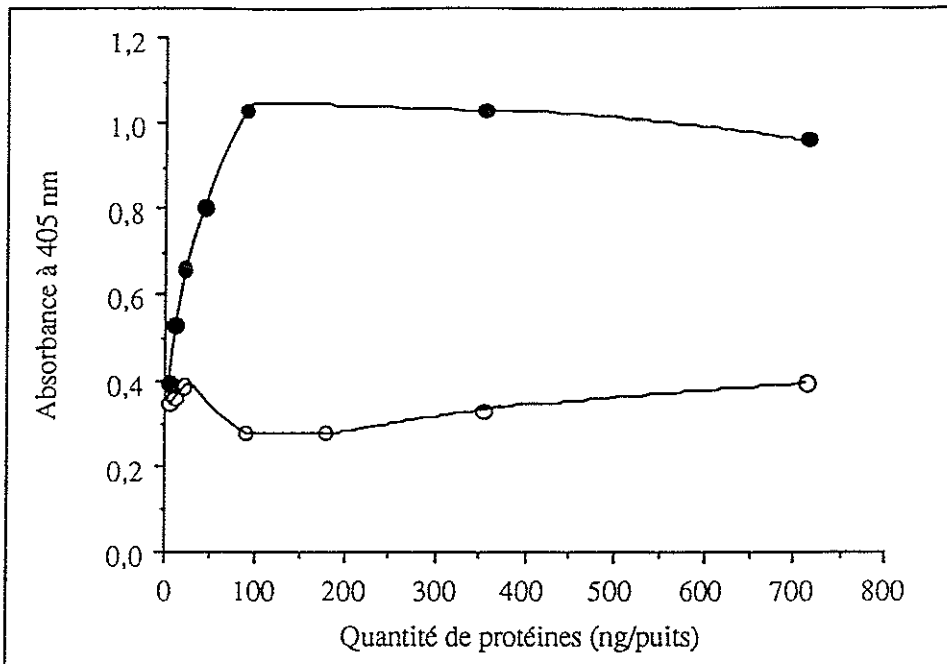


Figure IV-1. Détermination des quantités optimales de SAB-5S-AT (●) ou de SAB (○) pour sensibiliser les puits de microplaques ELISA. Le serum contenant des anticorps anti-LKM₂ est dilué au 1/100. Chaque point correspond à la moyenne de l'absorbance à 405 nm déterminée sur des duplicates de chaque concentration. La révélation peroxydasique se fait en 20 minutes avec l'ABTS comme substrat.

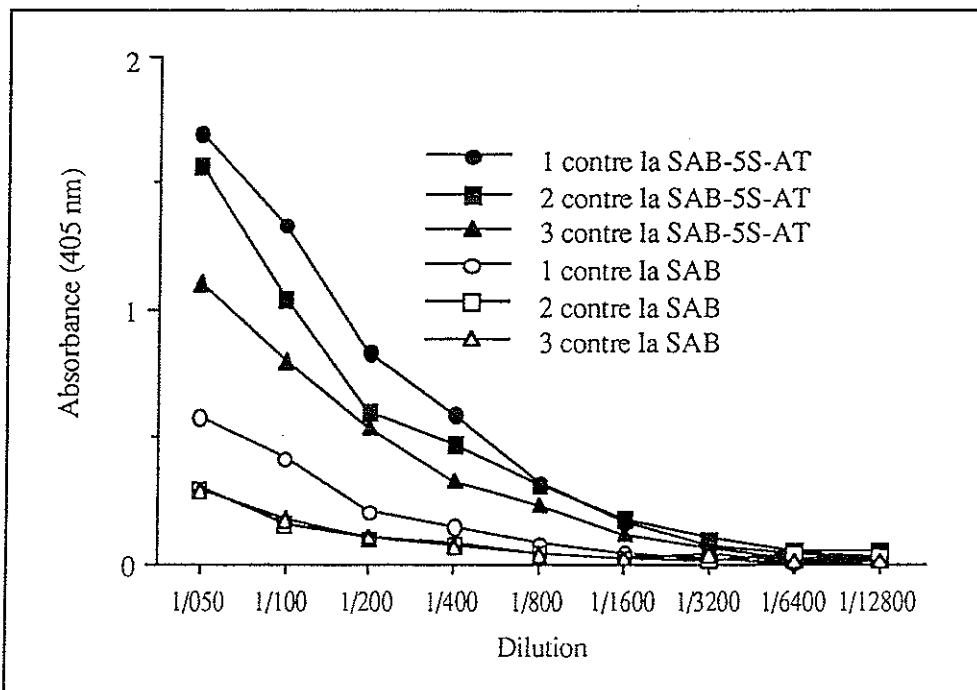


Figure IV-2. Réponse de trois sera de patients traités avec l'AT vis à vis de la SAB-5S-AT ou de la SAB en fonction de la dilution du serum. Le serum 1 contient des anticorps anti-LKM₂. Les puits sont sensibilisés avec 89.1 ng de SAB-5S-AT (soit 20 pmoles d'AT) ou avec la même quantité de SAB non modifiée. Chaque point correspond à la moyenne d'absorbance de 2 puits.

Les trois sera reconnaissent l'AT couplé à la SAB de façon très nette. En effet, les réponses anti-SAB-5S-AT sont nettement supérieures aux réponses anti-SAB pour tous les sera. Il ne semble pas exister de différence significative entre le serum 1 contenant des anticorps anti-LKM2 et les deux autres. Il faut néanmoins noter la présence d'un bruit de fond élevé dû à une reconnaissance importante de la SAB non modifiée. Afin de vérifier si le signal observé ne provient pas des modifications apportées à la SAB nous avons modifié le témoin de l'ELISA en utilisant non pas la SAB non modifiée mais la SAB thiolée qui sert au couplage à l'AT.

IV-2-3 Comparaison de la réponse de différents sera vis à vis de la SAB-5S-AT, de la SAB thiolée et de la SAB non modifiée

Le couplage de l'AT sur la SAB nécessite l'ajout d'un bras pontant fourni par le SPDP (voir figure II-2 p. 69). Après réduction du SPDP, les fonctions SH de la protéine thiolée qui n'ont pas réagi avec le 5-chloro AT sont bloquées par l'iodoacétamide. Nous avons vérifié que les sera reconnaissent les motifs AT liés à la SAB et non pas les modifications de la protéine liées à la thiolation et au blocage par l'iodoacétamide. Pour cela, nous avons donc effectué une nouvelle synthèse en suivant le protocole précédemment utilisé pour obtenir la SAB-5S-AT mais en bloquant l'ensemble des thiols de la SAB par l'iodoacétamide (figure IV-3). La SAB modifiée par l'ajout de fonctions SH bloquées par l'iodoacétamide est désignée SAB thiolée.

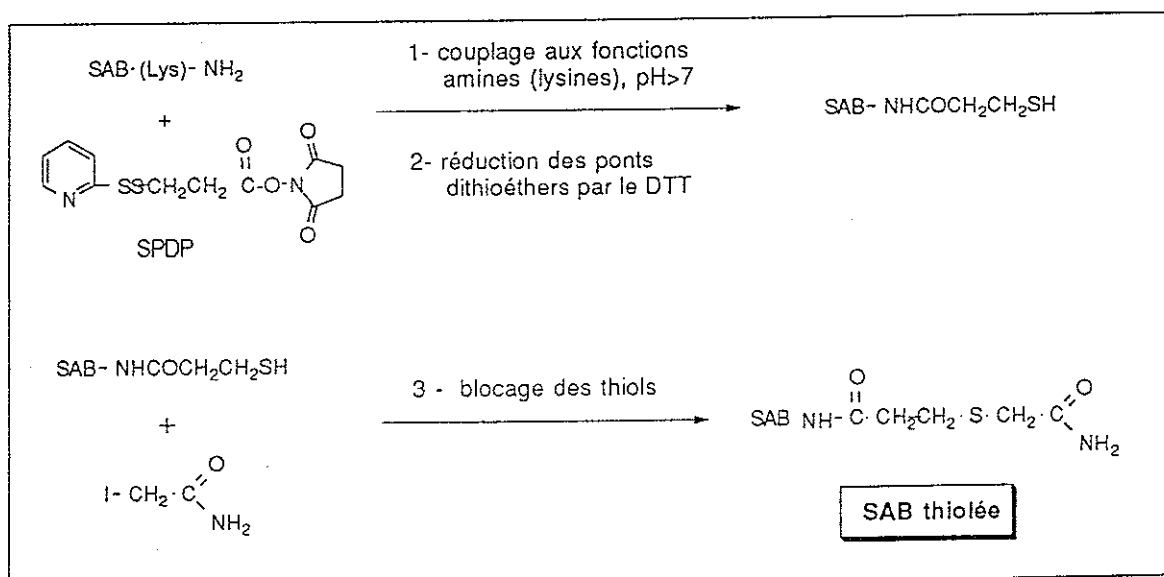


Figure IV-3. Principe de synthèse de la SAB thiolée.

Nous avons ensuite comparé les réponses anti-AT de sujets contrôles à celle de patients traités avec l'AT (patients 1, 2 et 3) en utilisant comme témoin soit la SAB non modifiée soit la SAB thiolée. La réponse anti-AT est définie comme la différence de réponse entre des puits sensibilisés avec le SAB-5S-AT et des puits sensibilisés avec le témoin. Les résultats de cette comparaison sont reportés sur le tableau IV-1. Quand la SAB non modifiée constitue l'antigène

Résultats

témoin du test ELISA, la réponse anti-AT des patients traités avec l'AT est nettement supérieure à celle des sujets contrôles. Quand la SAB thiolée constitue le témoin du test ELISA, la réponse anti-AT du patient dont le serum contient des anti-LKM₂ (patient 1) baisse. Cette baisse provient d'une reconnaissance plus importante de la SAB thiolée. Cependant, la réponse anti-AT de ce patient demeure près de 5 fois supérieure à celle des sujets contrôles. De plus, la reconnaissance de la SAB thiolée et de la SAB par les sera des patients 2 et 3 sont similaires. Ce résultat se traduit par des réponses anti-AT peu différentes quelque soit le témoin choisi. Par conséquent, l'utilisation de la SAB thiolée comme témoin du test ELISA tend à indiquer l'existence d'une sérologie anti-AT chez les patients traités par le diurétique.

Tableau IV-1. Réponses[†] anti-AT de sera de patients traités avec l'AT (sera 1,2 et 3) comparée à celle de sera contrôles en utilisant comme témoin soit la SAB soit la SAB thiolée.

Patient	Réponse anti-AT témoin : SAB	Réponse anti-AT témoin : SAB thiolée
1*	0.96	0.62
2	0.88	0.75
3	0.63	0.63
contrôles (n=5)	0.18 ± 0.11	0.13 ± 0.12

*Le serum du patient 1 contient des anticorps anti-LKM₂.

[†]Les valeurs correspondent à la différence d'absorbance à 405 nm entre 2 puits sensibilisés avec 89.1 ng (soit 20 pmoles de d'AT) de SAB-5S-AT et 2 puits sensibilisés avec la même quantité du témoin (SAB non modifiée ou SAB thiolée). Les réponses anti-AT des contrôles correspondent à la moyenne de 5 sera contrôles ± déviation standard. Les sera sont dilués au 1/100.

IV-3 Reconnaissance de la β LG-5S-AT par les sera humains

En raison de la reconnaissance importante de la SAB, nous avons testé la réponse des patients vis à vis de la β LG-5S-AT en utilisant comme témoin la β LG. Cette seconde protéine de référence allait également nous permettre de confirmer ou d'infirmer l'existence d'une sérologie anti-AT chez les patients traités avec le diurétique. Dans un premier temps, nous avons déterminé les quantités d'antigènes (β LG-5S-AT et β LG) adéquates pour sensibiliser les puits des microplaques ELISA.

IV-3-1 Détermination de la quantité d'antigène idéale pour sensibiliser les puits des microplaques ELISA

Nous avons testé la reconnaissance de deux sera (dont un contient des anticorps anti-LKM₂) de patients traités avec l'AT vis à vis des deux antigènes β LG-5S-AT et β LG. Pour cela, les

puits de microplaques ELISA ont été sensibilisées avec des quantités de BLG-5S-AT comprises entre 12.1 et 194 ng/puits (correspondant à une gamme de 3.75 à 60 pmoles d'AT/puits) ou avec les mêmes quantités de BLG non modifiée. La figure IV-4 présente les résultats de l'étalonnage du test ELISA pour ces deux antigènes. La sensibilisation des puits avec des quantités croissantes de BLG-5S-AT entraîne une augmentation du signal des sera 1 (contenant des anticorps anti-LKM2) et 2. Cependant, à partir d'une quantité de BLG-5S-AT égale à 64.6 ng par puits, la réponse des deux sera tend vers un plateau. Ceux-ci reconnaissent la BLG-5S-AT de façon importante. Néanmoins, la réponse du serum 1 est supérieure à celle du serum 2. La BLG non modifiée est très peu reconnue par les deux sera dans la gamme de quantités testée. En effet, l'absorbance ne varie que dans de faibles proportions et ne dépasse jamais les 0.2 unités. A partir de ces courbes, nous avons estimé que 64.6 ng de BLG-5S-AT correspondant à 20 pmoles d'AT constituait la quantité idéale pour sensibiliser les puits.

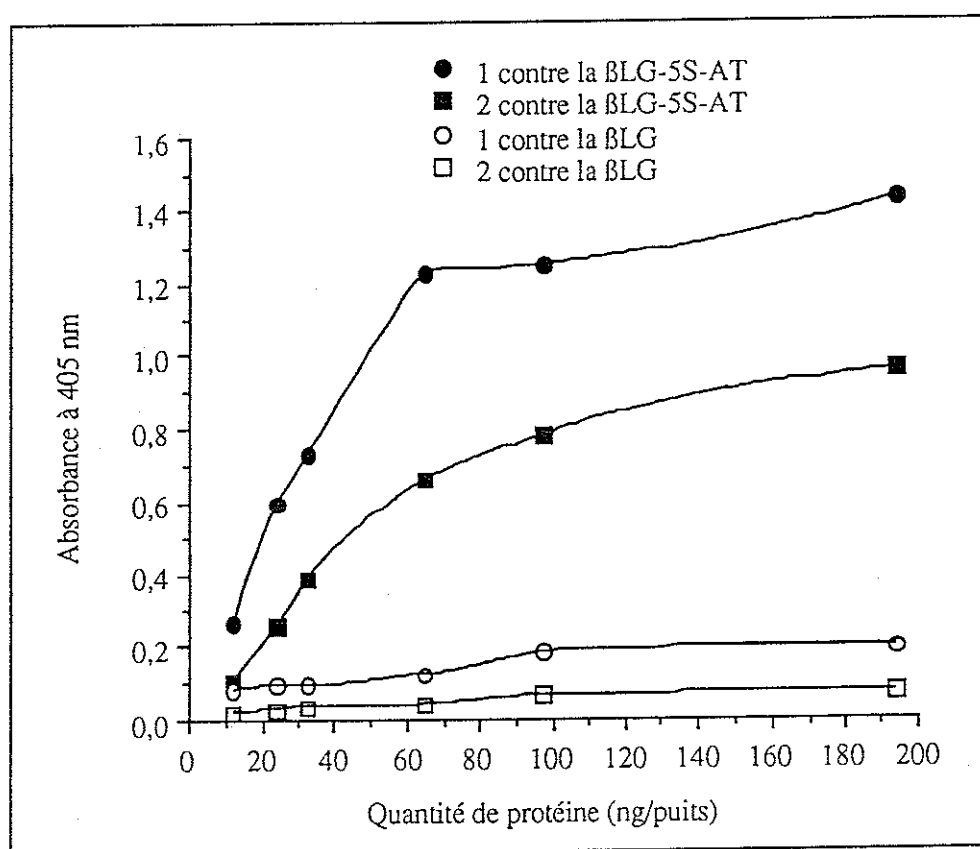


Figure IV-4. Détermination des quantités optimales de BLG-5S-AT ou de BLG pour sensibiliser des puits de microplaques ELISA. Les patients 1 et 2 ont été traités avec l'AT. Le serum 1 contient des anticorps anti-LKM2. Les deux sera sont dilués au 1/200. Chaque point correspond à la moyenne de l'absorbance à 405 nm déterminée sur des duplicates de chaque quantité d'antigène.

IV-3-2 Comparaison de la réponse anti-AT de différents groupes de sera

La réponse anti-AT définie par la différence de reconnaissance entre des puits sensibilisés avec la BLG-5S-AT et d'autres avec la BLG a été comparée pour trois groupes de sera. Le premier groupe est constitué par des sera contrôles de sujets qui n'ont jamais été traités avec l'AT. Le second correspond à des sera de patients traités avec l'AT mais qui n'ont pas contracté d'hépatite. Enfin, le troisième groupe rassemble les sera des patients atteints de l'hépatite induite par l'AT. Les résultats de cette étude sont présentés sur la figure IV-5.

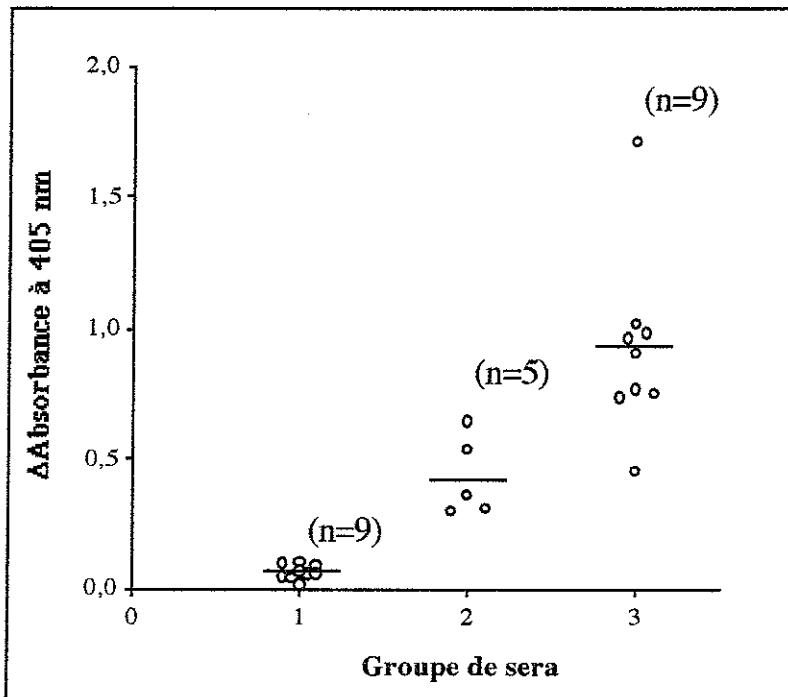


Figure IV-5. Comparaison de la réponse anti-AT de différents types de sera. Les puits sont sensibilisés en triplicate avec 64.6 ng de BLG-5S-AT (20 pmoles d'AT) ou par la même quantité de BLG non modifiée. Les sera sont dilués au 1/200. Les valeurs correspondent aux différences d'absorbance entre les puits sensibilisés par la BLG-5S-AT et ceux sensibilisés par la BLG. Groupe 1 : sera contrôles (sujets non traités avec l'AT), groupe 2 : sera de patients traités pendant plus d'un an avec l'AT, groupe 3 : sera de patients atteints de l'hépatite induite par l'AT.

La réponse anti-AT de l'échantillon de 9 sera contrôles est négligeable (0.06 ± 0.03) démontrant que des sujets non préalablement sensibilisés par l'AT ne reconnaissent pas le médicament. Par contre, les patients du groupe 2 traités avec l'AT pendant plus d'un an mais qui n'ont pas développé d'hépatite reconnaissent le diurétique et fournissent un signal moyen de 0.42 ± 0.15 . La comparaison des moyennes des réponses obtenues avec les sera du premier et second groupe par un test statistique de Student (petits échantillons) montre que la réponse anti-AT est significativement supérieure à celle des sujets contrôles au niveau $\alpha = 0.1\%$ ($p=0.001$). Les sera de patients qui ont développé l'hépatite induite par la prise d'AT

fournissent un signal moyen de 0.92 ± 0.34 . La réponse anti-AT de ce groupe de patients est par conséquent significativement supérieure à celle des sujets contrôles. Une comparaison des signaux moyens déterminés pour les patients des groupes 2 et 3 montre une différence significative. Ainsi les patients atteints de l'hépatite présentent une réponse anti-AT statistiquement supérieure aux personnes traités avec l'AT mais non atteints de l'hépatite au niveau $\alpha = 2\%$.

IV-3-3 Tentatives d'inhibition de la reconnaissance de la BLG-5S-AT par les sera de patients traités avec l'AT

Nous avons essayé d'inhiber la réponse anti-AT observée chez les patients traités par préincubation de leurs sera en présence de différents analogues structuraux de l'AT. Ces composés sont présentés sur la figure IV-6.

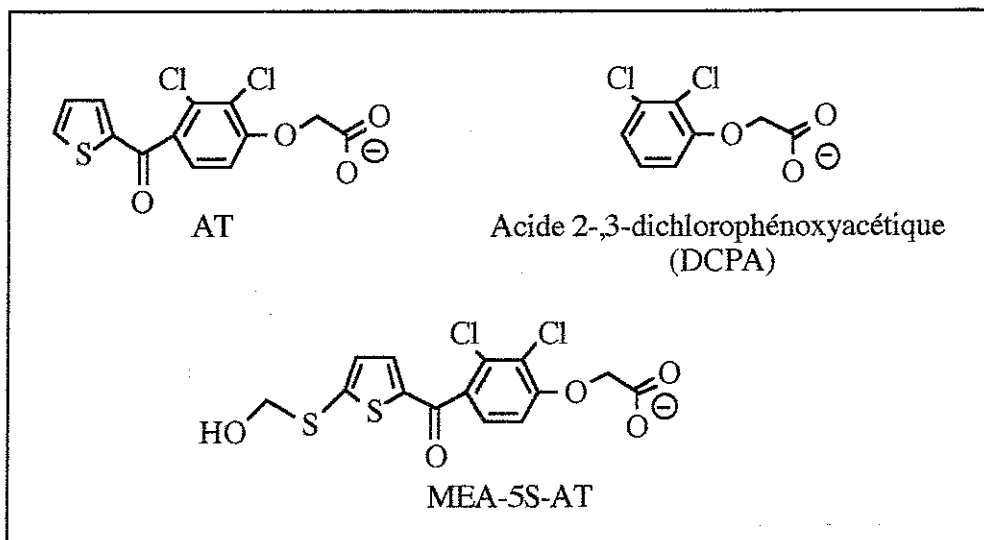


Figure IV-6. Structure des molécules testées pour inhiber la reconnaissance de la BLG-5S-AT par les sera de patients traités avec l'AT.

Ces molécules ont été préincubées à différentes concentrations pendant une nuit en présence de deux sera (notés 1 et 2) de personnes traitées avec l'AT. Le serum 1 provenant d'un patient atteint de l'hépatite induite par l'AT. Les sera sont dilués de manière à fournir un signal voisin de 0.5 unité d'absorbance en absence de tout inhibiteur potentiel. Les différents mélanges molécule à tester/serum sont ensuite déposés dans les puits de plaques ELISA sensibilisés avec de la BLG-5S-AT. Le résultat de la tentative d'inhibition de la reconnaissance de la BLG-5S-AT par les deux sera en fonction de la concentration des différentes molécules est présenté sur la figure IV-7. Ainsi, il apparaît que pour des concentrations comprises entre 10^{-9} et 10^{-3} M, aucune des trois molécules n'inhibe la reconnaissance de la BLG-5S-AT par les deux sera.

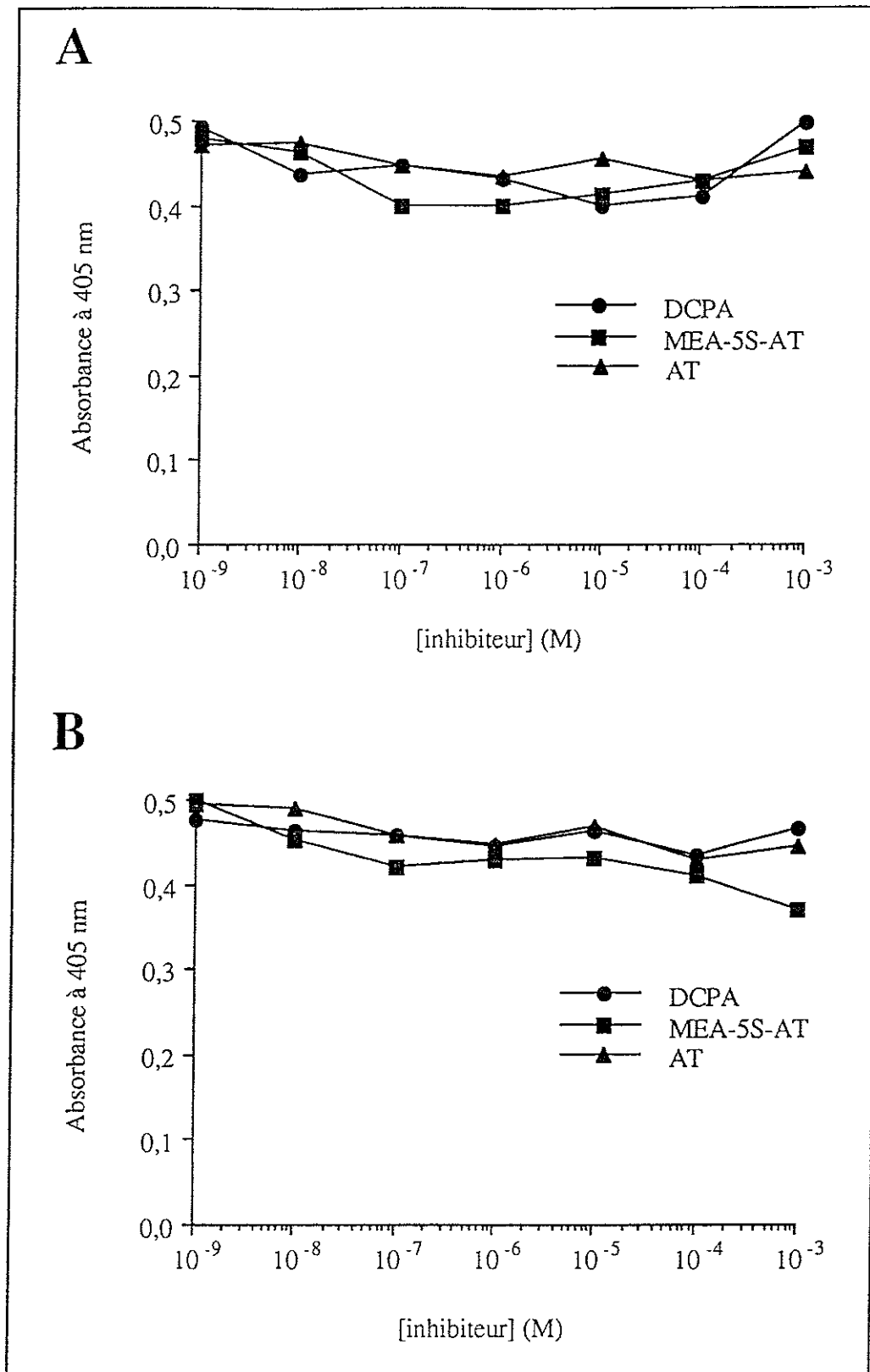


Figure IV-7. Tentative d'inhibition de la reconnaissance de la β LG-5S-AT par les sera de patients traités par l'AT en fonction de la préincubation de ces sera avec différentes molécules : acide dichlorophénoxyacétique (DCPA), mercaptoéthanol-5S-AT (MEA-5S-AT) et acide tiénilique (AT). A: serum dilué au 1/1200 d'un patient atteint de l'hépatite induite par l'AT. B: serum dilué au 1/800 d'un patient traité par l'AT pendant plus d'un an sans atteinte hépatique. Les puits sont sensibilisés avec 20 pmoles d'AT couplé à la β LG.

Résultats

Nous avons vérifié l'efficacité du test ELISA afin de confirmer que les conditions opératoires permettaient effectivement d'observer une inhibition de la reconnaissance de la β LG-5S-AT. Pour cela, nous avons préincubé le serum d'un patient traité avec l'AT avec différentes concentrations de β LG-5S-AT. Nous avons contrôlé la capacité de ce serum préincubé à reconnaître des puits sensibilisés par la β LG-5S-AT. Dans cette situation, l'antigène adsorbé au fond des puits et l'inhibiteur sont la même molécule. Le résultat de cette expérience est présenté sur la figure IV-8. La quantité nécessaire d'AT couplé à la β LG pour inhiber la moitié du signal est compris entre 20 à 30 pmoles/puits. Cette quantité correspond à celle d'AT utilisée pour la sensibilisation (20 pmoles/puits). Par conséquent, le test d'inhibition fonctionne et l'absence de décroissance du signal observé avec la préincubation des sera avec d'autres molécules n'est pas liée à un problème technique.

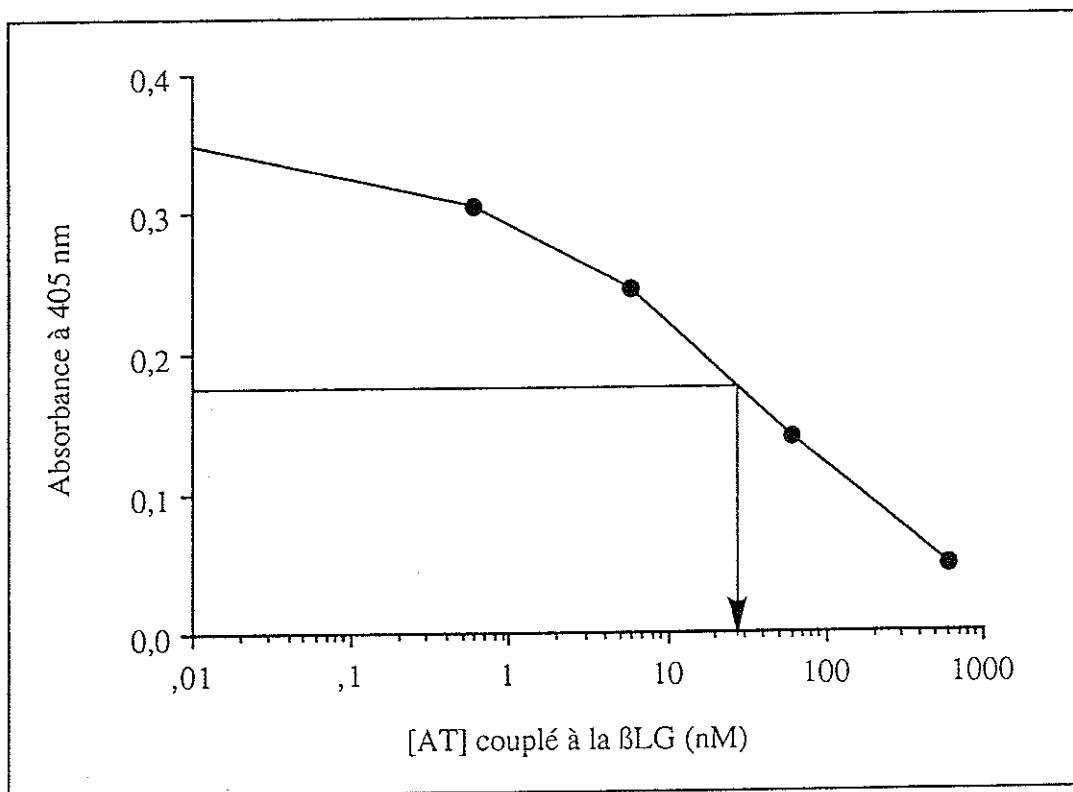


Figure IV-8. Inhibition de la reconnaissance de la β LG-5S-AT par un serum de patient traité avec l'AT en le préincubant avec la β LG-5S-AT. Les puits sont sensibilisés avec 64.6 ng de β LG-5S-AT (soit 20 pmoles d'AT). Le serum est dilué au 1/1200 et préincubé pendant une nuit avec différentes concentrations de β LG-5S-AT avant d'être ajouté dans les puits.

IV-4 Conclusion

Nous avons montré que les sera de tous les patients traités avec l'AT dont nous disposons possèdent des anticorps capables de reconnaître des protéines modifiées par le médicament. Ce constat repose sur l'observation suivante : la réponse de l'ensemble de ces sera vis à vis de motifs d'AT chimiquement couplés à 2 protéines différentes est largement supérieure à celle de sera contrôles. En particulier, ces différences de réponses sont statistiquement significatives dans le cas de l'étude réalisée avec la BLG-5S-AT. Il nous a semblé important de confirmer nos résultats par l'utilisation de deux protéines de références différentes. En effet, la reconnaissance de la SAB non modifiée par de nombreux sera entraînait un bruit de fond important. Cette reconnaissance parasite provient peut-être du fait que, physiologiquement, l'AT s'adsorbe de façon réversible sur les protéines plasmatiques telles que la SAH, l'homologue de la SAB chez l'homme. En effet, l'adsorption de l'AT sur les protéines plasmatiques s'élève à plus de 98% avec en particulier un site de liaison de haute affinité sur la SAH (Wood *et al.*, 1978 ; Vinay *et al.*, 1980). La reconnaissance par certains anticorps circulants de ces complexes SAH/médicament est donc possible. Ces anticorps auraient alors pu croiser avec la SAB-5S-AT nous laissant supposer à tort l'existence d'anticorps spécifiques d'une fixation covalente du médicament sur des protéines. Par conséquent, la démonstration de l'existence d'une réponse des sera des patients traités avec l'AT dirigée contre une autre protéine modifiée par le médicament s'avérait nécessaire. L'utilisation de la BLG-5S-AT nous a permis de confirmer les résultats obtenus avec la SAB-5S-AT. De plus, la reconnaissance négligeable de la BLG par l'ensemble des sera a considérablement augmenté la sensibilité du test ELISA. Cette sensibilité nous a permis d'observer une différence entre la réponse des patients traités avec l'AT mais sans atteinte hépatique et celle des personnes atteintes de l'hépatite induite par l'AT. Le niveau ($\alpha = 2\%$) du test de Student indique que cette différence est moins significative que celle observée entre des sujets contrôles et les patients (niveau $\alpha = 0.1\%$). Par conséquent et malgré le fait qu'un test positif au niveau $\alpha = 2\%$ soit déjà relativement puissant, il serait utile de confirmer cette différence. Pour cela, il faudrait étudier la réponse vis à vis de la BLG-5S-AT d'un échantillon plus important de patients traités mais non atteints de l'hépatite.

Globalement, nous avons mis en évidence une sérologie anti-AT chez les patients traités avec le diurétique. Ainsi il existe d'autres anticorps que les anti-LKM₂ dans le sera des sujets atteints de l'hépatite induite par la prise d'AT. Ce résultat démontre que ces patients présentent une sensibilisation vis à vis de néoantigènes induits par la prise du diurétique. Ces néoantigènes dérivent très probablement de la fixation covalente de l'AT sur des protéines hépatiques. Récemment, le groupe de Dominique Pessayre est arrivé à une conclusion similaire en utilisant entre autre la cytofluorométrie de flux (Robin *et al.*, 1996). Néanmoins, et contrairement à notre étude, ce groupe a observé une inhibition de la reconnaissance des protéines alkylées par l'AT libre. Cette différence provient peut-être du nombre important de motifs AT présentés par les

Résultats

protéines porteuses utilisées dans notre étude. En effet, notre test utilise des protéines pures qui présentent une densité d'épitopes très probablement supérieure à celle que fournit des adduits covalents de l'AT formés physiologiquement. Ainsi, le groupe de Dominique Pessayre constate une inhibition de la reconnaissance de la fixation covalente de l'AT pour une concentration du médicament égale à 1 mM. Cette concentration est importante au regard du nombre de molécules d'AT effectivement fixées sur les protéines. Par conséquent, dans notre étude, il est probable qu'une inhibition de la reconnaissance de la SAB-5S-AT ou de la BLG-5S-AT nécessite des concentrations bien plus importantes d'AT. La signification d'une inhibition par de simples mécanismes de compétition devient néanmoins difficile à démontrer dans ces conditions. Un argument en faveur de cette explication est apporté par les différences entre les IC₅₀ déterminées en ELISA pour des analogues de l'AT lors de la caractérisation des anti-AT obtenus chez le lapin après immunisation avec la SAB-5S-AT (voir tableau II-1 page 79). En effet, lorsque les puits sont sensibilisés avec des adduits microsomaux de l'AT, les concentrations d'analogues de l'AT nécessaires pour inhiber la reconnaissance de ces adduits par les anti-AT de lapin sont de l'ordre du nanomolaire. Par contre, quand les puits sont sensibilisés avec de la BLG-5S-AT, les concentrations en analogues permettant une inhibition de la reconnaissance des anti-AT sont 100 à 1000 fois plus élevées.

Conclusion générale

Ce travail a permis d'expliquer les premières étapes qui conduisent à l'apparition des anticorps anti-LKM₂ caractéristiques de l'hépatite induite par l'acide tiénilique (AT). En effet, les résultats de la première partie mettent en évidence que des sulfoxydes de thiophène sont générés lors de l'activation de l'isomère de l'acide tiénilique chez l'homme. Les sulfoxydes de thiophène sont des espèces électrophiles très réactives capable de se fixer de façon covalente sur les protéines. Ainsi, la formation d'adduits par l'AT chez l'homme provient très probablement également d'une telle formation de sulfoxydes de thiophènes. Les résultats de la deuxième partie démontrent clairement que la fixation covalente de l'AT sur les protéines hépatiques humaines *in vitro* présente un caractère très sélectif. En effet, le CYP2C9, l'enzyme responsable de l'activation de l'AT, est spécifiquement alkylée par le médicament. Cette protéine constitue la cible des anticorps anti-LKM₂ et il est raisonnable de penser que l'alkylation du CYP2C9 *in vivo* constitue une étape nécessaire à l'apparition des anti-LKM₂. Les résultats de la troisième partie montrent que la fixation covalente de l'AT sur les protéines hépatiques du rat ne possède pas le caractère spécifique déterminé chez l'homme. Cependant, le CYP2C11, le P450 principalement responsable de l'activation de l'AT chez le rat et l'homologue du CYP2C9 humain, constitue une cible privilégiée des métabolites réactifs de l'AT. De plus, ce P450 devient une cible aussi sélective que le CYP2C9 chez l'homme quand la fixation covalente non spécifique de l'AT est piégée par des molécules nucléophiles. A cet égard le rat constitue un animal modèle qui reproduit assez fidèlement la voie d'activation déterminée chez l'homme ainsi que le profil d'alkylation qui découle de cette activation. La cinétique de la fixation covalente de l'AT *in vivo* chez le rat montre que les adduits sont visibles dès 2 heures après une injection unique d'AT. Cette étude précise également que ces adduits présentent une durée d'existence courte (inférieure à 24 heures). L'observation microscopique de la fixation covalente sur coupes de foie de rat traités avec l'AT montrent sans ambiguïté que ces adduits sont principalement localisés sur les hépatocytes centrolobulaires. Cette situation chez l'homme pourrait permettre la présentation d'adduits au système immunitaire en favorisant les interactions avec les cellules immunocompétentes sanguines. Les résultats de la dernière partie semblent confirmer cette hypothèse. En effet, les patients traités avec l'AT présentent clairement une sensibilisation contre des antigènes qui portent le motif acide tiénilique. Les sujets affectés de l'hépatite semblent présenter une réponse plus importante que les sujets traités avec l'AT mais non atteints de la pathologie. L'existence d'anticorps dirigés contre l'AT apporte la preuve que des adduits probablement de type protéique sont présentés au système immunitaire chez l'homme.

Perspectives

Notre étude apporte des réponses claires concernant les premières étapes nécessaires à l'apparition des anticorps anti-LKM₂ chez l'homme. Néanmoins, les événements postérieurs à la fixation covalente de l'AT ne sont pas connus. Ainsi l'alkylation du CYP2C9 constitue très probablement une étape nécessaire mais cependant insuffisante pour permettre à elle seule le déclenchement de la réponse immunitaire. En effet, cette étape est commune à tous les sujets qu'ils soient atteints de l'hépatite ou non. De même, comment expliquer la rareté de survenue de l'hépatite alors que l'ensemble des patients traités que nous avons testé présentent une sensibilisation vis à vis du médicament ? Plusieurs approches peuvent à priori être entreprises afin d'apporter des éléments de réponse à ces questions. La première, consisterait à continuer d'utiliser le rat comme animal modèle pour étudier les étapes postérieures à la fixation covalente de l'AT sur les protéines hépatiques. Ainsi, il serait intéressant de déterminer si les adduits covalents générés lors de l'activation de l'AT sont capables d'induire une lyse des hépatocytes médiée par des cellules T cytotoxiques (CD8⁺) et/ou par des mécanismes d'ADCC. Pour cela, il faudrait immuniser des rats avec le conjugué β LG-5S-AT afin d'obtenir une réponse anti-AT. Les splénocytes de ces animaux immunisés pourraient alors être mis en culture avec des hépatocytes d'autres rats préalablement exposés à l'AT (*ex vivo* ou *in vitro*). Un tel système permettrait d'observation d'éventuels effets cytotoxiques liés à la reconnaissance des adduits protéiques de l'AT par les lymphocytes des rats immunisés avec l'AT. Ce type d'investigation a été mené dans le cas du diclofénac (Kretz-Rommel *et al.*, 1995) pour démontrer une lyse hépatocytaire médiée à la fois par des cellules T et des mécanismes d'ADCC. Cette lyse des hépatocytes était dépendante de la présence d'adduits protéiques du diclofénac à leur surface.

Une seconde approche permettrait de déterminer si les hépatocytes sont capables de présenter eux-même les adduits covalents de l'AT aux cellules du système immunitaire ou si la présentation est assurée par d'autres types de cellules (cellules de Kupffer, cellules B,...). Une telle étude peut être conduite à la fois *ex vivo* ou *in vitro*. Elle consisterait à incuber de l'AT en présence d'hépatocytes en culture et à suivre en microscopie à fluorescence à l'aide de deux anticorps différents 1) l'expression des adduits covalents et 2) l'expression des molécules de classe I ou II du CMH à la surface de l'hépatocyte. Si les hépatocytes sont capables de présenter les adduits covalents de l'AT en association avec les molécules de classe I ou II, un phénomène de capping devrait ainsi pouvoir être observé. En effet, en utilisant deux antisera, l'un couplé à la rhodamine et l'autre à la fluorescéine, il est possible d'observer la répartition de deux Ag simultanément sur la même préparation.

Résultats

Enfin, une troisième approche envisageable consisterait à déterminer si les lymphocytes T de patients atteints de l'hépatite induite par l'AT sont capables de proliférer en présence du médicament. Si tel était le cas, une telle étude permettrait de savoir quel sous-type de cellules T est préférentiellement stimulées et donc de savoir si la réponse est de type CD4⁺ ou CD8⁺ ou des deux types à la fois. Une stimulation simultanée des CD4⁺ ou CD8⁺ impliquerait une présentation des adduits dépendante à la fois des classe I et des classes II du CMH. Ce cas est rencontré avec des médicaments qui nécessitent une métabolisation intracellulaire : carbamazépine, phénytoïne ou sulfaméthoxazole (Mauri-Hellweg *et al.*, 1995).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I Produits et réactifs

Produit ou réactif	Origine
acide 2,3-dichlorophénoxyacétique	Janssen
acide azino-2,2' di(éthyl-3' benzthiazoline sulfonique (ABTS)	Sigma
acide chlorhydrique 9.46 N	Merck
acide éthacrynique	Sigma
acide tiénilique	Anphar-Rolland
[C ¹⁴ fonction cétone] AT (56 μ Ci/ μ mol)	Anphar-Rolland
acrylamide	Biorad
adjuvants de Freund	Sigma
DETAPAC	Sigma
dithionite de sodium	Sigma
dithiotréitol	Sigma
dodécyl sulfate de sodium (SDS)	Serva
eau oxygénée 30%	Merck
iodoacétamide	Sigma
isomère de l'acide tiénilique	Anphar-Rolland
[C ¹⁴ CO-Ar] IAT (25 μ Ci/ μ mol)	Anphar-Rolland
N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP)	Sigma
nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate réduit (NADPH)	Boehringer-Mannheim
nicotinamide-adénosine-dinucléotide réduit (NADH)	Boehringer-Mannheim
serum albumine de boeuf (SAB)	Sigma
β mercaptoéthanol	Merck
Trizma base	Serva
Tween 20	Merck

II Traitement des animaux et préparation des fractions microsomales et cytosoliques hépatiques

Animaux

Des rats mâles Sprague Dawley (Iffa Credo) pesant environ 200 g subissent une période d'acclimatation de 10 jours : température constante de 24°C, éclairément nyctéméral, nourriture (AO4 de chez UAR) et eau *ad libitum*. Ils sont alors traités avec l'inducteur de cytochromes P450. Après une dernière nuit de jeûne, les animaux sont sacrifiés par dislocation

Matériels et méthodes

cervicale puis exsanguinés par section carotidienne. Le foie est immédiatement prélevé et la fraction microsomale préparée.

Induction au phénobarbital

Le traitement au phénobarbital dure une semaine. L'inducteur est dilué à raison de 1 g/litre dans l'eau de boisson.

Induction au clofibrate

Les rats subissent trois jours d'induction avec des injections (ip) journalières de clofibrate à raison de 500 mg/kilo/jour dans l'huile de tournesol.

Préparation des microsomes et cytosols de foies de rats

Le protocole utilisé est décrit sur la figure 1 ; Dans le cas de la préparation de microsomes humains, le foie est broyé à l'Ultra Turrax avant homogénéisation au Potter-Elvehjem. L'étape de lavage au pyrophosphate permet l'élimination de l'hémoglobine (Kremers *et al.*, 1981).

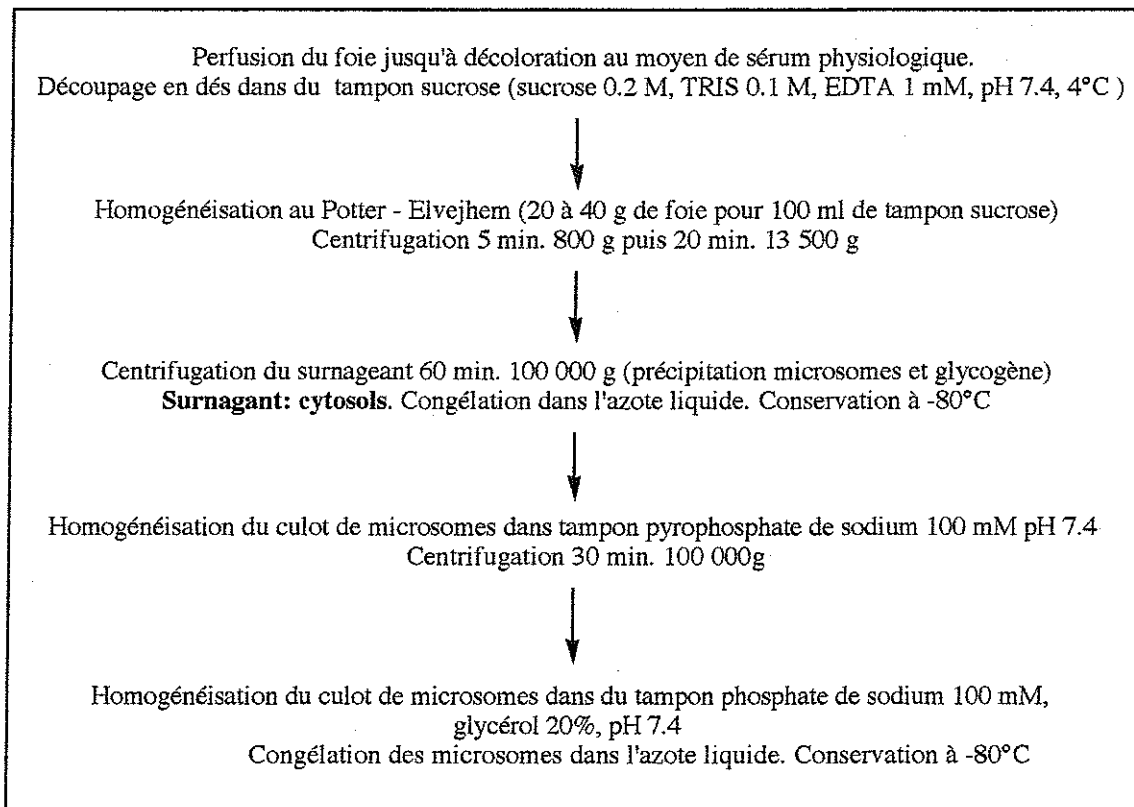


Figure 1. Préparation des fractions microsomales et cytosoliques hépatiques. Toutes les étapes se déroulent à 4°C.

Dosage des protéines

La concentration en protéines est déterminée à l'aide du kit de dosage BCA (Pierce) en utilisant la SAB comme référence.

Dosage du contenu en cytochromes P450 et b5

La concentration en cytochromes P450 est déterminée par la méthode de Omura et Sato (Omura *et al.*, 1964). La suspension microsomale est répartie dans 2 cuves à bords noirs. Celle de la cuve échantillon est réduite par addition de quelques grains de dithionite de sodium. Le cytochrome b5 est dosé par spectrophotométrie d'absorption différentielle entre la suspension microsomale réduite et la suspension microsomale non réduite ($\epsilon_{427-410 \text{ nm}}=181 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). La suspension microsomale de la seconde cuve est ensuite également réduite. La cuve échantillon est alors saturée en monoxyde de carbone par barbotage. L'absorption du complexe P450-CO est mesurée par spectrophotométrie d'absorption différentielle ($\epsilon_{450-490 \text{ nm}}=91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). Toutes les mesures d'absorbance sont effectuées sur un spectrophotomètre KONTRON 820.

III Métabolisme de l'IAT *in vitro* chez l'homme

Incubations analytiques

Les incubations sont réalisées dans des tubes à hémolyse pour un volume final de 150 μl . Elles contiennent des microsomes fraîchement décongelés à la concentration en P450 de 0.2 μM , de l'IAT 100 μM et différentes concentrations de mercaptoéthanol. L'ensemble est dilué dans du tampon phosphate de sodium (0.1 M, pH 7.4 contenant du DETAPAC 1 mM). Après équilibration à 37°C des incubations et du système générateur de NADPH (G6PDH 2 U/ml, G6P 10 mM et NADP 1 mM) pendant 3 min sous agitation, la réaction est démarrée par addition du système générateur de NADPH. La durée de l'incubation est de 20 minutes à 37°C avec agitation. Les incubations témoins sont réalisées en l'absence de système générateur de NADPH (remplacé par du tampon phosphate pH 7.4).

Préparation des échantillons CLHP

L'incubation est arrêtée par addition de 80 μl (pour 150 μl d'incubat) d'un mélange acétonitrile/acide acétique ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 72.5/7.5 v/v). Après 10 min à 4°C, les protéines sont séparées au moyen d'une centrifugation (Mikroliter (Hettich) à 14 000 g de

10 min. L'acétonitrile est évaporé par un flux d'azote et le volume restant repris par un excès de tampon acétate de sodium 100 mM pH 4.6 et conservé à -80°C avant l'analyse par CLHP.

Incubations préparatives et prépurification sur SepPack

Des volumes de 10 à 50 ml permettent la préparation de quantités nécessaires à l'analyse des métabolites. L'incubation est agitée doucement durant 20 à 60 min à 37°C afin de limiter la floculation des microsomes, puis refroidie à 4°C avant une centrifugation de 10 min à 2 000 g. Le surnageant est passé sur un SepPack C18 et, après rinçage à l'eau pure, les métabolites sont élués par 2 ml de méthanol. Le bilan réactionnel et les rendements sont calculés grâce à un marquage faible de l'IAT à 0.5 Ci/mol.

Réalisation des éluogrammes CLHP et des radiochromatogrammes

Les échantillons sont injectés dans une colonne à polarité de phase inverse (MOS HYPERSIL C18 5 µm, 250 x 4.6 mm). L'éluion est effectuée avec un débit de 1 ml/min par un mélange de deux solvants A et B. Le solvant polaire A est un tampon acétate de sodium 100 mM, pH 4.6, et le solvant B, un mélange eau/acétonitrile 50/50 v/v. Les conditions de gradient utilisées sont les suivantes : pendant 6 min 33% de B en isocratique, montée à 45% de B au temps t=6 min puis passage de 45 à 100% en 7 min. En sortie de colonne, les éluogrammes sont déterminés par spectrophotométrie d'absorption UV ou visible multilongueur d'onde en temps réel au moyen du système Spectra FOCUS (Spectra-Physics). Les fractions de 0.5 ml sont collectées toutes les 30 secondes dans des tubes de propylène de 3 ml. Après addition de 2 ml de liquide scintillant Picofluor 30 (Packard), la radioactivité est comptée au moyen d'un compteur à scintillation Tricarb 4500 (Packard) avec correction de l'extinction par étalonnage externe. Ce comptage fournit les radiochromatogrammes correspondants aux éluogrammes de CLHP.

Mesure de la fixation covalente aux protéines microsomales

La méthode employée est une adaptation de la technique décrite par Wallin (Wallin *et al.*, 1981). Des aliquotes de 50 µl d'incubat sont déposés sur des filtres en fibres de verre GF/B (Whatman). Les filtres sont alors immédiatement immergés dans une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique 10% qui précipite les protéines à leur surface. L'AT ou l'IAT libre est extrait par transfert des filtres dans deux bains de méthanol pendant 10 min et un dernier bain d'acétate d'éthyle. Les filtres sont ensuite séchés à l'air libre puis déposés dans des fioles de polyéthylène. La quantité d'AT ou d'IAT fixé sur les protéines est calculée par comptage de la radioactivité associée aux filtres après addition de 2 ml de toluène scintillant (Packard).

Études en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les échantillons purifiés par CLHP sont lyophilisés et repris par 0.3 ml de solvant deutérié (DMSO-D₆ 100%). Les spectres de RMN ¹H sont enregistrés sur un spectromètre 250 MHz (Bruker WM 250). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane Si(CH₃)₄.

Autres techniques spectroscopiques

Les spectres d'absorption UV-visible sont enregistrés sur un appareil KONTRON 820. Les spectres de masse sont obtenus sur un appareil NERMAG R10-10 par ionisation chimique (NH₃) ou par impact électronique. Les résultats sont exprimés en pourcentage du pic de base (100%) ; le terme Cl₂ indique la présence d'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 ³⁵Cl et ³⁷Cl.

Préparation d'un échantillon authentique I issu de la réduction de la fonction cétone de l'IAT

A une solution isopropanolique d'IAT (5 mg dans 2 ml), on ajoute NaBH₄ en large excès. La réaction est arrêtée au bout de 3 heures à température ambiante par de l'eau (1 ml). Après évaporation partielle de l'alcool sous flux d'azote, le pH est descendu à 1 au moyen d'HCl et les produits de la réaction extraits par l'acétate d'éthyle. Une chromatographie sur plaque de silice (toluène/acétate d'éthyle/acide acétique 15/60/5 v/v/v) conduit à un produit majoritaire (rf = 0.42) qui répond aux caractéristiques attendues pour un produit de réduction de la cétone de l'IAT en alcool avec une masse M de 332 (m/z (NH₃) = 315 (20%, Cl₂, M - H₂O + H⁺), 332 (2%, Cl₂, M - H₂O + NH₄⁺) et m/z (IE., impact électronique) = 332 (10%, Cl₂, M), 247 (10%, Cl₂, perte du noyau thiophène et de deux hydrogènes)). Le spectre RMN ¹H du sel d'ammonium de ce composé en solution dans le DMSO-D₆ comporte le signal d'un proton supplémentaire en singulet (1H) à 5.98 ppm à côté des signaux du groupe phénoxyacétate (OCH₂ (4.16 ppm, s, 2H), H_{2'} (7.41 ppm, 1 H, d 9 Hz) et H_{3'} (6.81 ppm, 1H, d 9 Hz)), et de ceux des trois protons du noyau thiophène (H₂ (7.21 ppm, 1H, dd 1.5-3 Hz), H₄ (6.96 ppm, 1H, dd 1.5-5 Hz) et H₅ (7.40 ppm, 1H, dd 3-5 Hz)).

Préparation du métabolite I

De l'IAT (100 μ M) est incubé en présence de microsomes SP1 (P450 0.4 μ M, d'un système générateur de NADPH et de mercaptoéthanol (5 mM) pendant 30 min à 37°C (volume de l'incubation 25 ml). Les métabolites sont prépurifiés par passage sur un système sep-pack et

séparés par CLHP. Le métabolite **I** est recueilli et analysé par RMN ¹H en solution dans le DMSO-D₆ et par spectrométrie de masse. Le spectre de masse en ionisation chimique (NH₃) permet de retrouver les fragments à 315 (100%, Cl₂, M - H₂O + H⁺) et à 332 (20%, Cl₂, M - H₂O + NH₄⁺) tandis que l'étude en RMN ¹H montre un spectre superposable à celui de l'authentique **1**.

IV Étude de la fixation covalente de l'AT et de l'IAT

Conservation des souches

Les souches originelles données par F. Guengerich et Ph. Beaune ont été conservées à -80°C à partir de cultures initiales auxquelles ont été ajoutées 15% de glycérol (v/v) avant congélation. Des réensemencements successifs sur milieu solide dans des boîtes de Pétri conservées à 4°C permettent de disposer des souches en permanence.

Transformation de la levure

L'isolement et le séquençage du clone ADNc humain MP-4 (*CYP2C9*) ont été précédemment décrits (Umbenhauer *et al.*, 1987 ; Ged *et al.*, 1988 ; Brian *et al.*, 1989a). Brièvement, la séquence d'ADNc est insérée dans le vecteur pAAH5 (ADH1 promoteur et terminateur) contenant le gène *leu2*. La souche D12 [a, leu⁻, (cir⁺)] de *Saccharomyces cerevisiae* constitue le vecteur d'expression retenu. Pour des détails sur la construction du vecteur pAAH5/MP-4 et la transformation de la souche de levure, consulter les références (Brian *et al.*, 1989a,b ; Srivastava *et al.*, 1991).

Composition du milieu de culture et conditions de culture

Le milieu de culture synthétique minimum et stérile [0.67% (m/m) Difco "yeast nitrogen base without amino acids"] contient 2% (m/v) de glucose et est enrichi par un mélange d'acides aminés exempt de leucine. La souche de levure transformée pAAH5/MP-4 est cultivée en anaérobiose à 28°C sous agitation continue. La croissance des cellules est estimée en mesurant l'absorbance à 600 nm (en phase exponentielle de croissance, le temps de division cellulaire est de l'ordre de 140 min). En fonction de la croissance de la préculture, des cultures de grand volume (1,5 l) sont ensemencées. Elles sont arrêtées par refroidissement à 4°C lorsque l'absorbance atteint 1.7 à 1.8 unités d'absorbance (5.10⁷ cellules/ml).

Préparation des microsomes de levure

Les microsomes de levure sont préparés selon la méthode décrite par (Brian *et al.*, 1989a ; Guengerich *et al.*, 1991b). Brièvement, la préparation se décompose en trois étapes (figure 2) :

- digestion enzymatique de la paroi polysaccharidique (avec la lyticase),
- lyse des spéroplastes,
- purification de la fraction microsomale (par centrifugation différentielle).

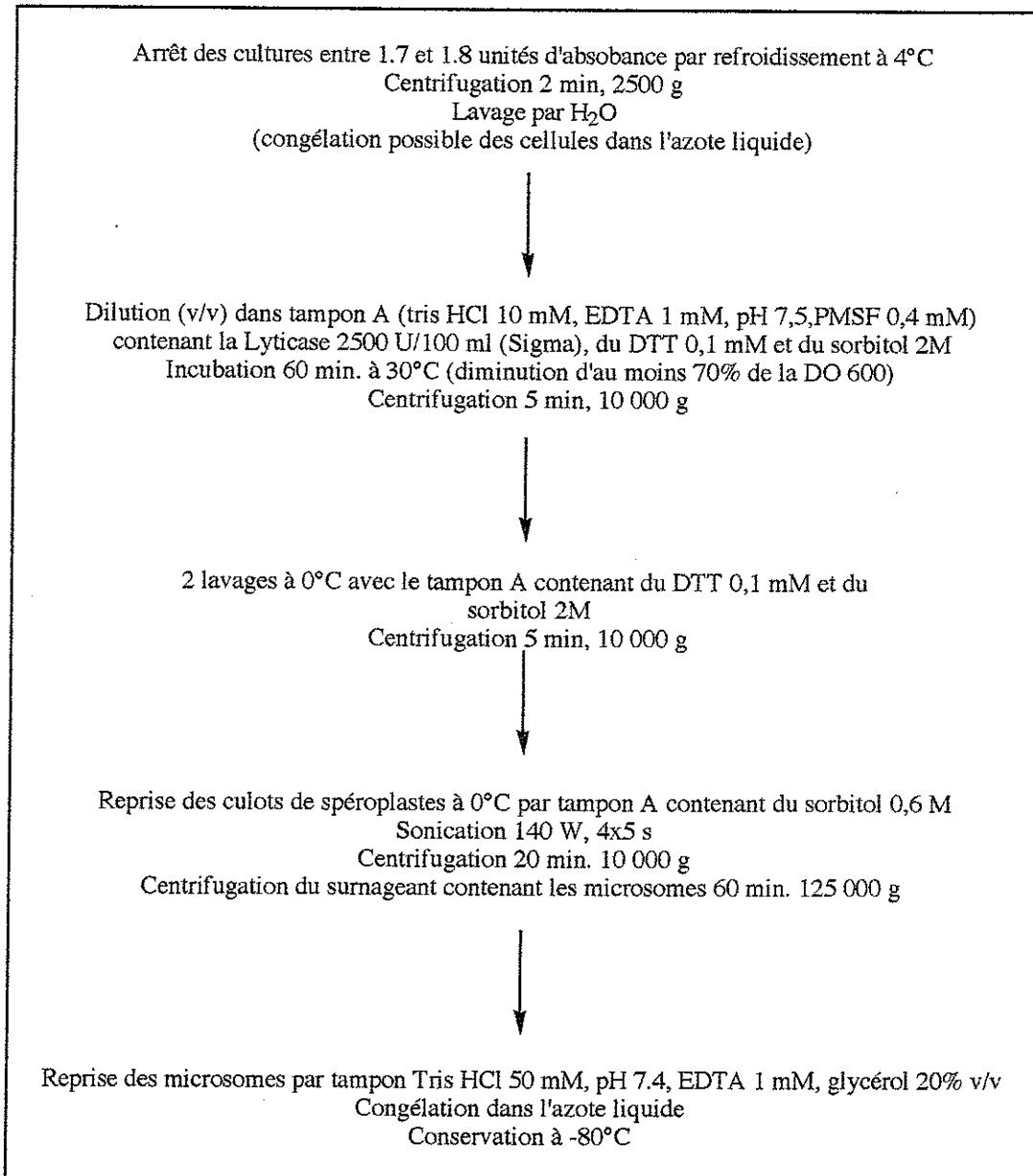


Figure 2. Préparation des microsomes de levure

Protocole des incubations d'AT ou d'IAT en présence des microsomes

Les incubations sont réalisées dans des tubes à hémolyse pour un volume final de 300 μ l. Elles contiennent des microsomes fraîchement décongelés à la concentration en P450 de 0.2 (microsomes de levures pAAH5/MP-4) ou 1 μ M (microsomes hépatiques humains et de rat), de l'AT ou de l'IAT 100 μ M, et du GSH 5 mM si spécifié. L'ensemble est dilué dans du tampon phosphate de sodium (0.1 M, DETAPAC 1 mM, pH 7.4). La réaction est démarrée par l'addition de NADPH 1 mM. La durée de l'incubation est de 20 minutes à 37°C avec agitation. Les incubations témoins sont réalisées en l'absence de NADPH (remplacé par le tampon phosphate de l'incubation). Les préparations microsomales utilisées dans cette étude sont les suivantes :

- levure : 0.06 nmole de CYP2C9/mg de protéine,
- foie humain SP1, 0.17 ; SN4, 0.25 et SN6, 0.49 nmole de P450/mg de protéine
- foie de rat : contrôles, 0.88 ± 0.08 ; clofibrate, 2.10 ± 0.51 ; phénobarbital, 1.91 ± 0.33 nmole de P450/mg de protéine

Effet du mercaptoéthanol sur la fixation covalente de l'AT

Au bout de 30 min d'incubation (microsomes humains 1 μ M, AT 100 μ M, NADPH 1 mM, volume de 1 ml, 30 min à 37°C), des aliquotes de 140 μ l d'incubat sont mélangés (v/v) avec des solutions de mercaptoéthanol à différentes concentrations (312.5 à 2500 μ M dans du tampon phosphate 100 mM pH 7.4). Après 60 min d'incubation à 37°C, on mesure le taux de fixation covalente de l'IAT aux protéines microsomales (voir page 133).

Synthèse du mercaptoéthanol-5S-AT (MEA-5S-AT)

Le chlore de l'acide 5-chloro tiénilique est substitué par le groupement thiol du mercaptoéthanol. Pour cela, l'acide 5-chloro tiénilique (200 mg) est dissout dans du tampon carbonate 0.1 M désoxygéné, pH 10.3 (50 ml). Le mercaptoéthanol (100 μ L) est alors ajouté à la solution. La substitution dure 6 jours à 50°C sous atmosphère d'argon. Les produits sont précipités par HCl 2N et extraits à l'acétate d'éthyle. Après lavage à l'eau, le produit est purifié par chromatographie sur couche mince silicagel (acétate d'éthyle /méthanol/acide acétique 90/10/1) $r_f=0.18$. Une fraction du MEA-5S-AT obtenu est alors méthylée par CH_2N_2 dans l'éther et ensuite analysée par spectrométrie de masse (SM) et RMN ^1H . SM CI NH_3 : 435 [5% (M+ NH_4^+)], 421 [100% (M+ H^+)], 379 [4% (M+ H^+ - $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$)], 362 [2% (M+ H^+ - CO_2Methyl)], 345 [6% (M+ H^+ - $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$)]. RMN ^1H (CDCl_3) δ 3.17 ppm (t, J=6 Hz, 2H, SCH_2), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.88 (q, J=12, 6 Hz, 2H, HO-CH_2), 4.78 (s, 2H, OCH_2), 6.78 (d, J=8.5 Hz, 1H, H-2'), 7.02 (d, J=4 Hz, 1H, H-4), 7.22 (d, J=4 Hz, 1H, H-3), 7.28 (d, J=8.5 Hz, 1H, H-3').

Synthèse de la SAB-5S-AT par la méthode au SPDP

Thiolation de la SAB

Dans un ballon, sont successivement mélangés 3 ml de tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7.5 dégazé sous argon, 33 mg de SAB puis 300 μ l, 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 SAB). Après 60 min à température ambiante, en atmosphère neutre et sous agitation douce, 1.1 ml d'une solution de DTT 100 mM est ajouté et on laisse à nouveau réagir pendant 60 min. La SAB thiolée est alors purifiée sur une colonne (IBF 16G400, \varnothing 2 cm, 2 ml/min) contenant un gel de trisacryl GF05M. L'élution est effectuée 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 avec le tampon d'élution comme référence et la concentration de SAB est mesurée par son absorption UV à 278 nm ($A_{278} = 0,63$ unité pour une solution de SAB à 1 mg/ml). On trouve 32 thiols par molécule de SAB, soit une fixation quantitative du SPDP.

Couplage avec l'acide 5-chloro tiénilique

Le pH de la fraction contenant la SAB thiolée est amené à 9.3 au moyen de K_2CO_3 . Après addition d'1 ml d'une solution aqueuse d'acide 5-chloro tiénilique 20 mM (0.2 Ci/mol), 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 SAB est mesuré régulièrement sur des aliquotes par précipitation des protéines en milieu acide sur filtre de fibre de verre et comptage de la radioactivité associée (voir page 133). En fin de réaction, le pH est redescendu à 7 au moyen d'acide acétique et la SAB-5S-AT est purifiée sur la colonne précédemment utilisée pour la SAB thiolée. L'élution est effectuée par un tampon acétate de sodium 100 mM pH 5.5. Le pH de la fraction qui contient les protéines (à 10 min) est amené à 10, on ajoute de l'iodoacétamide 3 mM. Après 30 min à 40°C, les protéines sont lavées par deux fois 30 volumes de tampon acétate de sodium 100 mM, pH 5.5 après concentrations successives par ultrafiltration (Système Amicon, membrane d'exclusion à 30 000 Daltons). Après lyophilisation, 13 mg de SAB-5S-AT sont récupérés avec un rendement de 40% par rapport à la SAB initiale.

Techniques immunochimiques

Immunisation

Le protocole et les techniques employés pour cette immunisation sont ceux décrits par (Catty, 1988) et (Dresser, 1986). Une solution de SAB-5S-AT dans du serum physiologique est émulsionnée (v/v) avec de l'adjuvant de Freund avant d'être administrée en de multiples points d'injection sous-cutanée au flanc de chaque lapine. La première injection contient 500 μ g de SAB-5S-AT et de l'adjuvant complet, les rappels sont effectués tous les deux mois avec de l'adjuvant incomplet et 500 μ g de SAB-5S-AT pour le premier rappel puis 100 μ g pour les suivants. A partir du deuxième rappel, le sang est collecté 10 à 15 jours après l'injection.

Réalisation des prélèvements et préparation des sera

L'oreille est désinfectée au moyen d'alcool à 70°C. La veine externe est vasodilatée par du toluène puis sectionnée franchement au moyen d'une lame de bistouri. De 30 à 40 ml de sang sont collectés par lapin. Les prélèvements sont ensuite incubés 60 min à 37°C puis une nuit à 4°C. Les sera sont séparés des coagulums et conservés à -20°C.

Obtention de la fraction des immunoglobulines

Les immunoglobulines sont fractionnées en une étape par précipitation au sulfate d'ammonium (Ternynck *et al.*, 1987). A 60 ml de serum, sont ajoutés 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 3 000 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 serum initial soit 30 ml. Le dosage des protéines selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) est de 40.6 mg/ml, soit le chiffre habituel de 20 g Ig/l de serum. 4 ml de cette préparation sont conservés à 4°C en présence d'azide de sodium (10 mM) puis utilisés pour l'étude de la réponse anti-AT ; le reste est congelé.

Protocole des tests ELISA

Ces tests sont réalisés sur des plaques de 96 puits (Nunc) selon le protocole de Ternynck et Avrameas (Ternynck *et al.*, 1987). Le protocole utilisé est décrit sur la figure 3. Les solutions sont distribuées avec une pipette Proline (Biohit) et les lavages avec un distributeur Nunc-Immuno wash 8 (Nunc). La lecture est faite par mesure de l'absorbance à 405 nm sur un lecteur de plaque Dynatech MR700. Chaque mesure est corrigée de l'absorbance du puits témoin et correspond à la moyenne de deux puits. Les anticorps anti-IgG de lapin ou humaines marqués à la peroxydase (Dako P217 et P214 respectivement) sont dilués au 1/500-ème.

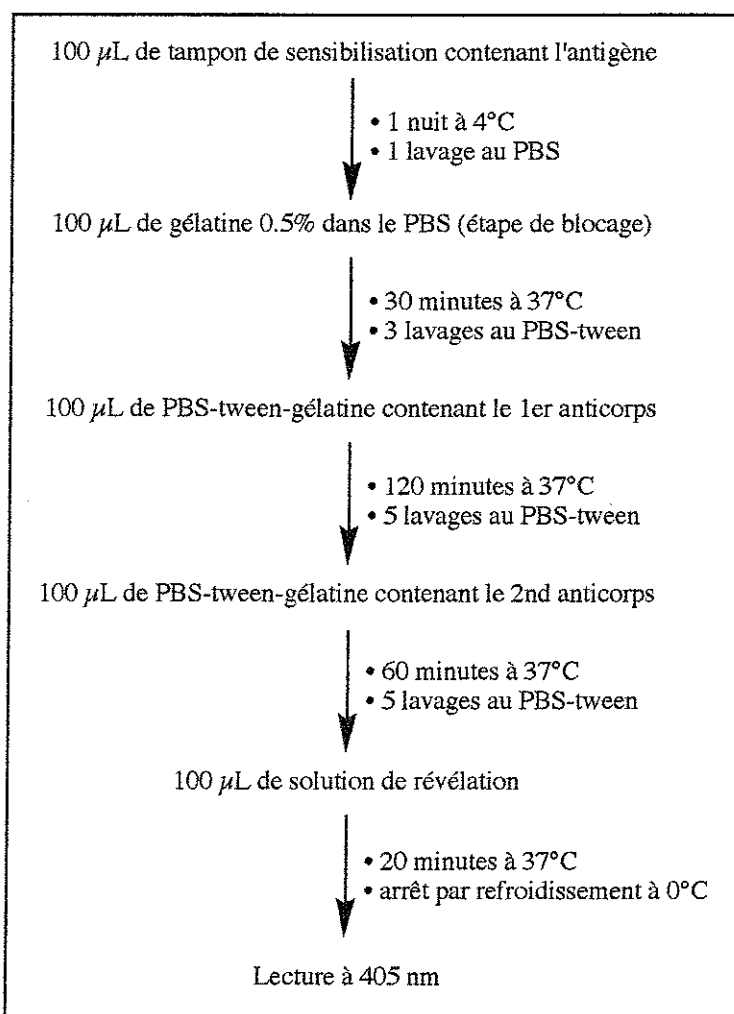


Figure 3. Étapes du protocole des tests ELISA. PBS 100 mM, pH 7.4. Le PBS-Tween contient 0.1% de Tween 20, le PBS-Tween-gélatine contient 0.5% de gélatine. Tampon de sensibilisation : tampon bicarbonate 50 mM, pH 9.5. Solution de révélation : 1.5 mM d'ABTS, 0.007% d'eau oxygénée diluée dans du tampon citrate 42 mM, pH 5.6.

Préparation des métabolites de l'IAT fixés aux protéines microsomales

Les métabolites de l'IAT fixés aux protéines microsomales sont traités en fin d'incubation par de l'HCl afin de les stabiliser (Valadon, 1992). De l'IAT 100 μ M est incubé en présence de microsomes de rats traités au clofibrate (P450 1 μ M) et de système générateur de NADPH à 37°C pendant 20 min. 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 10 000 g dans des tubes en polycarbonate). Le culot est alors dissout dans de la soude 0.1N (moitié du volume de l'incubation initiale) par sonication à 75 Watts à 0°C pendant 10 min (la solution des protéines dans la soude présente 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 les valeurs attendues (19 nmole d'IAT/nmole P450 et 3.5 nmole AT/nmole P450) avec une absence de fixation covalente sur les protéines des incubations de référence. Le dosage des protéines, que se soit par la méthode de Lowry ou avec le kit BCA (Pierce), ne retrouve que 60% des protéines attendues.

Électrophorèse et transfert

En fin d'incubation (volume de 300 μ L), les protéines sont précipitées par ajout de TCA 10% pendant 10 min à 4°C. Les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 1 500 g puis l'IAT non lié aux protéines ou ses métabolites solubles sont extraits du culot par 2 rinçages au TCA 5% suivis de 3 à l'acétate d'éthyle, un à l'acétone, un à l'éthanol et enfin un au tampon d'incubation. Entre chaque étape d'extraction, une centrifugation de 10 min à 1 500 g est effectuée. Finalement, les protéines sont remises en suspension dans 100 μ L de SDS 1% pendant une nuit à 37°C. Un dosage des protéines est réalisé sur un aliquote de chaque échantillon. Ces derniers sont dilués volume à volume avec la solution de dénaturation des protéines (SDS 1%, β mercaptoéthanol 5%, glycérol 30%, pyronine 0.01%, Tris/HCl 2.2 M, pH 6.8). Ces mélanges sont ensuite portés à 95°C pendant 5 minutes. Les gel de compression et de séparation contiennent respectivement 4.5 et 9% d'acrylamide. Les dépôts protéiques sont de 15 ou 20 μ g/puits (peigne de 20 puits). La migration des protéines (système d'électrophorèse vertical Hoefer) dure en moyenne 3 heures avec un courant constant de 40 mA/gel (générateur Apelex ST 606T). Le transfert électrophorétique des protéines semi-sec sur membrane de nitrocellulose dure une heure avec le Trans-Blot SD (Biorad) avec un courant constant de 400 mA. La visualisation des protéines s'effectue par coloration au rouge Ponceau.

Immunorévélations

Les bandelettes de nitrocellulose sont plongées dans la solution de saturation (PBS-Tween 0.05%, PVP 1%) pendant une heure. Après deux lavages au PBST, le premier anticorps, dilué dans la solution de saturation, est ajouté. Suivent 5 lavages au PBST et les bandelettes sont incubées en présence de l'anticorps anti-immunoglobulines de lapin ou humaines couplé à la peroxydase de Raifort (Dako P217 ou P214 respectivement) dilué dans la solution de saturation. Après 6 lavages, l'activité peroxydasique est révélée avec le luminol (kit ECL d'Amersham) sur papier photosensible dans l'obscurité. Pour cela, les membranes de nitrocellulose sont recouvertes de papier photosensible (Hyperpaper d'Amersham) et enfermées dans une cassette autoradiographique (Amersham). La révélation du papier se fait avec le révélateur Dektol du kit Kodak EDF/EDP pendant 30 secondes, passage dans un bain d'eau courante et dans le fixateur pendant 1 minute. Les épreuves sont ensuite rincées à l'eau courante pendant 2 minutes.

Révélations in situ sur coupes de foie de rat

Des prélèvements cubiques de 5 mm³ sont prélevés sur les foies de rats et immédiatement plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Ces prélèvements sont ramenés à une température de -17°C au moment de la réalisation des coupes sur un Kryostat 1720 (Leitz). Celles-ci mesurent 10 µm d'épaisseur et sont déposées sur lames de verre gélatinées. Les coupes sont conservées à -30°C jusqu'à utilisation. Avant révélation, les coupes sont immergées dans du tampon phosphate (PB) 0.1 M, pH 7.2 contenant 10% de formol. Suivent 3 lavages de 5 min avec le PB. Le blocage des sites libres sur les coupes se fait avec du PBS contenant 0.1% de SAB, 1% de gélatine et 0.1% de serum de chèvre pendant 1 heure à température ambiante. Après 1 lavage au PBS, les coupes sont incubées en présence des anti-AT dilués au 1/500 dans la solution de blocage pendant une nuit à 4°C. Suivent 3 lavages de 5 minutes avec du PBS et l'incubation pendant 1 heure en présence d'une goutte de l'anticorps biotinylé anti-Ig (du kit Vectastain ABC (Vector) dilué dans la solution de blocage. Après 3 lavages avec le PBS, les coupes sont incubées à l'obscurité en présence de 2 gouttes des réactifs A (avidine DH) et B (peroxydase de Raifort H biotinylée) du kit Vectastain ABC diluées dans du PBS. Après 2 lavages au PBS et un avec du Tris 0.05 M, pH 7.1, la révélation de l'activité peroxydasique se fait avec la diaminobenzidine (1 mg/ml dans le tampon Tris contenant 0.01% d'eau oxygénée). L'arrêt de la réaction s'effectue par lavage avec un excès de tampon Tris. Les tissus hépatiques sont ensuite desséchés par trempage des lames pendant 1 minute dans des bains d'alcool de plus en plus concentrés (70, 95 et 100%) suivis d'un dernier dans du toluène. Une lamelle de verre est collée sur la lame à l'aide de résine d'exclusion Eukitt (Kindler). Les coupes sont ensuite observées sur un microscope Olympus BH2 relié à une caméra couleur Sony DXC-930P connectée à un PC pour

Matériels et méthodes

l'acquisition numérique. La visualisation et le traitement des images numériques se fait avec le logiciel Biocom-Visiolab 1000. L'impression des photos numériques est réalisée avec l'imprimante Mitsubishi CP2000 sur des feuilles de papier Mitsubishi CK2000S.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références

- Ade, P., Guastadisegni, C., Testai, E. and Vittozzi, L. (1994) Multiple activation of chloroform in kidney microsomes from male and female DBA/2J mice. *J. Biochem. Toxicol.* **9**, 289-295.
- Ahokas, J.T., Davies, C., Ravenscroft, P.J. and Emmerson, B.T. (1984) Inhibition of soluble glutathion S-transferase by diuretic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1929-1932.
- Aichinger, G. and Lechler, R.I. (1995) Antigen processing and presentation. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 657-660.
- Aklillu, E., Persson, I., Bertilsson, L., Johansson, I., Rodrigues, F. and Ingelmannsundberg, M. (1996) Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 441-446.
- Amouzadeh, H.R. and Pohl, L.R. (1995) Processing of endoplasmic reticulum luminal antigens associated with halothane hepatitis in rat hepatocytes. *Hepatology* **22**, 936-943.
- Anders, M.W., Dekant, W. and Vamvakas, S. (1992) Glutathione-dependent toxicity. *Xenobiotica* **22**, 1135-1145.
- Anders, M.W., Lash, L., Dekant, W., Elfarra, A.A. and Dohn, D.R. (1988) Biosynthesis and biotransformation of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. *Crit. Rev. Toxicol.* **18**, 311-341.
- Andersson, T., Regardh, C.G., Dahl-Puustinen, M.L. and Bertilsson, L. (1990) Slow omeprazole metabolizers are also poor S-mephenytoin hydroxylators. *Ther. Drug Monitoring* **12**, 415-416.
- Asai, H., Imaoka, S., Kuroki, T., Monna, T. and Funae, Y. (1996) Microsomal ethanol oxidizing system activity by human hepatic cytochrome P450s. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 1004-1009.
- Atchinson, M. and Adesnik, M. (1983) A cytochrome P450 multigene family: characterization of a gene activated by phenobarbital administration. *J. Biol. Chem.* **258**,
- Awad, J.A., Horn, J.L., Roberts, L.J. and Franks, J.J. (1996) Demonstration of halothane-induced hepatic lipid peroxidation in rats by quantification of F-2-isoprostanes. *Anesthesiology* **84**, 910-916.
- Badger, T.M., Huang, J., Ronis, M. and Lumpkin, C.K. (1993) Induction of cytochrome P450 2E1 during chronic ethanol exposure occurs via transcription of the CYP 2E1 gene when blood alcohol concentrations are high. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 780-785.
- Bailey, D.G., Spence, J.D., Munoz, C. and Arnold, J.M.O. (1991) Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine. *Lancet* **37**, 268-269.
- Bailey, M.J. and Dickinson, R.G. (1996) Chemical and immunochemical comparison of protein adduct formation of four carboxylate drugs in rat liver and plasma. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 659-666.
- Banks, A.T., Zimmerman, H.J., Ishak, K.G. and Harter, J.G. (1995) Diclofenac-associated hepatotoxicity: analysis of 180 cases reported to the Food and Drug Administration as adverse reactions. *Hepatology* **22**, 820-827.
- Bargetzi, M.J., Aoyama, T., Gonzalez, F.J. and Meyer, U.A. (1989) Lidocaine metabolism in human liver microsomes by cytochrome P4503A4. *Clin. Pharmacol. Ther.* **46**, 421-427.

Références

- Barnes, K.A. and Mitchell, R.N. (1995) Detection of functional class III-associated antigen: role of a low endosomal compartment in antigen processing. *J. Exp. Med.* **181**, 1715-1727.
- Bars, R.G., Bell, D.R. and Elcombe, C.R. (1993) Induction of cytochrome P450 and peroxysomal enzymes by clofibrac acid *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 2045-2053.
- Battioni, P., Mahy, J.-P., Delaforge, M. and Mansuy, D. (1983) Reaction of monosubstituted hydrazines and diazenes with rat-liver cytochrome P450. *Eur. J. Biochem.* **134**, 241-248.
- Beaune, P., Dansette, P.M., Mansuy, D., Finck, M., Amar, C., Leroux, J.P. and Homberg, J.C. (1987) 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**, 551-555.
- Bequemont, L., Lebot, M.A., Riche, C. and Beaune, P. (1996) Influence of fluvoxamine on tacrine metabolism *in vitro*: Potential implication for the hepatotoxicity *in vivo*. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **10**, 156-157.
- Bell, S.J.D. and Pichler, W.J. (1989) Penicillin-allergic patients react to penicillin-modified "self". *Allergy* **44**, 199-203.
- Benham, A.M. and Neefjes, J.J. (1995) Antigen processing by the class I pathway. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 664-669.
- Berson, A., Wolf, C., Berger, V., Fau, D., Chachaty, C., Fromenty, B. and Pessayre, D. (1991) Generation of free radicals during the reductive metabolism of the nitroaromatic compound, nilutamide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **257**, 714-719.
- Berson, A., Renault, S., Letteron, P., Robin, M.A., Fromenty, B., Fau, D., Lebot, M.A., Riche, C., Durandschneider, A.M., Feldmann, G. and Pessayre, D. (1996) Uncoupling of rat and human mitochondria: A possible explanation for tacrine-induced liver dysfunction. *Gastroenterology* **110**, 1878-1890.
- Black, S.D. (1992) Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes. *FASEB J.* **6**, 680-684.
- Bloksma, N., Kubicka-Muranyi, M., Schuppe, H.-C., Gleichmann, E. and Gleichmann, H. (1995) Predictive immunotoxicological test systems: suitability of the popliteal lymph node assay in mice and rats. *Crit. Rev. Toxicol.* **25**, 369-396.
- Boccaccio, F., Attali, P., Nataf, J., Ink, O., Fabre, M. and Pelletier, G. (1987) Hépatite aiguë due à la dihydralazine. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **11**, 614.
- Boelsterli, U.A., Zimmerman, H.J. and Kretz-Rommel, A. (1995) Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs: molecular mechanisms and pathology. *Crit. Rev. Toxicol.* **25**, 207-235.
- Bourdi, M., Larrey, D., Nataf, J., Bernuau, J., Pessayre, D., Iwasaki, M., Guengerich, F.P. and Beaune, P. (1990) Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P-450 1A2. *Am. Soc. Clin. Invest.* **85**, 1967-1973.
- Bourdi, M., Larrey, D., Nataf, J., Bernuau, J., Pessayre, D., Iwasaki, M. and Guengerich, F.P. (1991) Antimicrosomal antibodies: what are they telling us? *Hepatology* **13**, 385-387.
- Bourdi, M., Tinel, M., Beaune, P.H. and Pessayre, D. (1994) Interactions of dihydralazine with cytochromes P450 1A: a possible explanation for the appearance of anti-P4501A2 autoantibodies. *Mol. Pharmacol.* **45**, 1287-1295.

Références

- Bourdi, M., Demady, D., Martin, J.L., Jabbour, S., Martin, B., George, J. and Pohl, L. (1995) cDNA cloning and *Baculovirus* expression of the human liver endoplasmic reticulum P58: characterization as a protein disulfide isomerase isoform, but not as a protease or a carnithine acyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* **323**, 397-403.
- Breen, K., Wandscheer, J.C., Peignoux, M. and Pessayre, D. (1982) *In situ* reaction of the acetaminophen metabolite covalently bound in kidney and lung. Supportive evidence provided by total hepatectomy. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 115-116.
- Brian, W.R., Ged, C., Bellew, T.M., Srivastava, P.K., Bork, R.W., Umbenhauer, D.R., Lloyd, R.S. and Guengerich, F.P. (1989a) Human liver mephenytoin 4'-hydroxylase cytochrome P-450 proteins and genes. *Drug Metab. Rev.* **20**, 449-465.
- Brian, W.R., Srivastava, P.K., Umbenhauer, D.R., Lloyd, R.S. and Guengerich, F.P. (1989b) Expression of a human liver cytochrome P-450 protein with tolbutamide hydroxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **28**, 4993-4999.
- Brian, W.R., Sari, M.-A., Iwasaki, M., Shimada, T., Kaminsky, L.S. and Guengerich, F.P. (1990) Catalytic activities of human liver cytochrome P450 3A4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **29**, 11280-11292.
- Brian, W.R., Srivastava, P.K., Umbenhauer, D.R., Lloyd, R.S. and Guengerich, F.P. (1989) Expression of a human liver cytochrome P-450 protein with tolbutamide hydroxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **28**, 4993-4999.
- Broly, F., Gaedigk, A., Heim, M., Eichelbaum, M., Morike, K. and Meyer, U.A. (1991) Debrisoquine/sparteine hydroxylation genotype and phenotype: analysis of common mutations and alleles of CYP2D6 in a European population. *DNA Cell Biol.* **10**, 545-558.
- Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**, 33-39.
- Brown, R.M., Taleishi, T., Guengerich, F.P., Wood, M. and Wood, A.J.J. (1995) Halothane microsomal oxidation is inhibited by diethyldithiocarbamate, an inhibitor of CYP2E1. *Anesth. Analg.* **80**, S60.
- Butler, A.M. and Murray, M. (1993) Inhibition and Inactivation of Constitutive Cytochromes P450 in Rat Liver by Parathion. *Mol. Pharmacol.* **43**, 902-908.
- Butler, L.E., Thomassen, D., Martin, J.L., Martin, B.M., Kenna, J.G. and Pohl, L.R. (1992) The calcium-binding protein calreticulin is covalently modified in rat liver by a reactive metabolite of the inhalation anesthetic halothane. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 406-410.
- Catty, D. (1988) *Antibodies. Volume I. A practical approach*, (Rickwood, D. and Hames, B.D. Ed.), IRL Press, Washington DC.
- Chen, J., Nikolova-Karakashian, M., Merrill, A.H. and Morgan, E.T. (1995) Regulation of cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) gene expression by interleukin-1, sphingomyelin hydrolysis, and ceramides in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 25233-25238.
- Christen, U., Bürgin, M. and Gut, J. (1991) Halothane metabolism: immunochemical evidence for molecular mimicry of trifluoroacetylated liver protein adducts by consecutive polypeptides. *Mol. Pharmacol.* **40**, 390-400.
- Christen, U., Jenö, P. and Gut, J. (1993) Halothane metabolism: the dihydrolipoamide acetyltransferase subunit of the pyruvate dehydrogenase complex molecularly mimics trifluoroacetyl-protein adducts. *Biochemistry* **32**, 1492-1499.

Références

- Christen, U., Quinn, J., Yeaman, S.J., Kenna, J.G., Clarke, J.B., Gandolfi, A.J. and Gut, J. (1994) Identification of the dihydrolipoamide acetyltransferase subunit of the human pyruvate dehydrogenase complex as an autoantigen in halothane hepatitis. Molecular mimicry of trifluoroacetyl-lysine by lipoic acid. *Eur. J. Biochem.* **223**, 1035-1047.
- Clarke, J.B., Thomas, C., Chen, M., Hastings, K.L. and Gandolfi, A.J. (1995) Halogenated anesthetics form liver adducts and antigens that cross-react with halothane-induced antibodies. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **108**, 24-32.
- Corcoran, G.B., Mitchell, J.R., Vaishnav, Y.N. and Horning, E.C. (1980) Evidence that acetaminophen and N-hydroacetaminophen form a common arylating intermediate, N-acetyl-p-benzoquinone imine. *Mol. Pharmacol.* **18**, 536-542.
- Cribb, A.E., Nuss, C.E., Alberts, D.W., Lamphere, D.B., Grant, D.M., Grossman, S.J. and Spielberg, S.P. (1996) Covalent binding of sulfamethoxazole reactive metabolites to human and rat liver subcellular fractions assessed by immunochemical detection. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 500-507.
- Cuppvickery, J.R., Li, H.Y. and Poulos, T.L. (1994) Preliminary crystallographic analysis of an enzyme involved in erythromycin biosynthesis: cytochrome P450eryF. *Protein Struct. Funct. Genet.* **20**, 197-201.
- Cuppvickery, J.R. and Poulos, T.L. (1995) Structure of cytochrome P450eryF involved in erythromycin biosynthesis. *Nature Struct. Biol.* **2**, 144-153.
- Dahlin, D.C., Miwa, G.T., Lu, A.Y.H. and Nelson, S.D. (1984) N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 1327-1331.
- Daly, A.K., Brockmoller, J., Broly, F., Eichelbaum, M., Evans, W.E., Gonzalez, F.J., Huang, J.D., Idle, J.R., Ingelmannsundberg, M., Ishizaki, T., Jacqzaigrain, E., Meyer, U.A., Nebert, D.W., Steen, V.M., Wolf, C.R. and Zanger, U.M. (1996a) Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics* **6**, 193-201.
- Daly, A.K., Fairbrother, K.S., Andreassen, O.A., London, S.J., Idle, J.R. and Steen, V.M. (1996b) Characterization and PCR-based detection of two different hybrid CYP2D7P/CYP2D6 alleles associated with the poor metabolizer phenotypes. *Pharmacogenetics* **6**, 319-328.
- Danielsson, H. and Sjövall, J. (1975) Bile acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 233-253.
- Dansette, P.M., Amar, C., Smith, C., Pons, C. and Mansuy, D. (1990) Oxidative activation of the thiophene ring by hepatic enzymes. Hydroxylation and formation of electrophilic metabolites during metabolism of tienilic acid and its isomer by rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 911-918.
- Dansette, P.M., Amar, C., Valadon, P., Beaune, P. and Mansuy, D. (1991) Hydroxylation and formation of electrophilic metabolites of tienilic acid and its isomer by human liver microsomes: catalysis by a cytochrome P450 2C different from that responsible for mephenytoin hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **14**, 553-560.
- Davila, J.C., Martin, B.M. and Pohl, L.R. (1992) Patients with halothane hepatitis have serum antibodies directed against glucose-regulated stress protein GRP78/BiP. *Toxicologist* **12**, 255.
- Davis, C.D., Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., Allott, R.L., Smith, D. and Park, B.K. (1995) Kinetic parameters of lymphocyte microsomal epoxide hydrolase in carbamazepine hypersensitive patients - Assessment by radiometric HPLC. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1361-1366.

- Davis, M.M. and Chien, Y.-H. (1993) Topology and affinity of T-cell receptor mediated recognition of peptide-MHC complexes. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 45-49.
- Dayer, P., Balant, L., Kupfer, A., Striberni, R. and Leemann, T. (1985) Effect of oxidative polymorphism (debrisoquine/sparteine type) on hepatic first-pass metabolism of bufuralol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **28**, 317-320.
- Dayer, P., Desmeules, J., Leemann, T. and Striberni, R. (1988) Bioactivation of the narcotic drug codeine in human liver is mediated by the polymorphic monooxygenase catalysing debrisoquine 4-hydroxylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 411-416.
- de Montellano, P.R.O. and Correia, M.A. (1995a) Inhibition of cytochrome P450 enzymes *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry (second edition)*, (de Montellano, P.O. Ed.), Plenum Press, New York.
- de Montellano, P.R.O. (1995b) The 1994 Bernard Brodie Award Lecture. Structure, mechanism, and inhibition of cytochrome P450. *Drug Metab. Dispos.* **23**, 1181-1187.
- de Montellano, P.R.O. (1984) The inactivation of cytochrome P-450. *Annu. Rep. Med. Chem.* **19**, 201-211.
- de Montellano, P.R.O. (1995) *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, (de Montellano, P.R.O. Ed.), Plenum Press, New York.
- de Montellano, P.R.O. and Reich, N.O. (1986) Inhibition of cytochrome P-450 enzymes, Ed.), Plenum Press, New York, pp 307-315.
- de Morais, S.M.F., Wilkinson, G.R., Blaisdell, J., Meyer, U.A., Nakamura, K. and Goldstein, J.A. (1994a) Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of *S*-mephenytoin in Japanese. *Mol. Pharmacol.* **46**, 594-598.
- de Morais, S.M.F., Wilkinson, G.R., Blaisdell, J., Nakamura, K., Meyer, U.A. and Goldstein, J.A. (1994b) The major defect responsible for the polymorphism of (*S*)-mephenytoin metabolism in humans. *J. Biol. Chem.* **269**, 15419-15422.
- Dekant, W. and Vamvakas, S. (1992) Glutathione-dependent toxicity. *Xenobiotica* **22**, 1135-1145.
- Dickinson, R.G. and King, A.R. (1993) Studies on the reactivity of acyl glucuronides. Glucuronide derived covalent binding of diflunisal to bladder tissue of rats and its modulation by urinary pH and β -glucuronidase. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1175-1182.
- Distlerath, L.M., Reilly, P.E.B., Martin, M.V., Davis, G.G., Wilkinson, G.R. and Guengerich, F.P. (1985) Purification and characterization of the human liver cytochromes P450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin *O*-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* **260**, 9057-9067.
- Distlerath, L.M. and Guengerich, F.P. (1987) Enzymology of human liver cytochromes P-450 *Mammalian cytochromes P-450, vol. 1*, (Guengerich, F.P. Ed.), CRC Press, Boca Raton, pp 133-198.
- Dresser, D.W. (1986) Immunization of experimental animals *Handbook of Experimental Immunology*, (Weir Ed.), Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp 8.1-8.21.
- Durak, I., Guven, T., Birey, M., Ozturk, H.S., Kurtipek, O., Yel, M., Dikmen, B., Canbolat, O., Kavutcu, M. and Kacmaz, M. (1996) Halothane hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in guinea pigs; The effects of vitamin E. *Can. J. Anaesth.* **43**, 741-748.

Références

- Eade, O.E., Grice, D., Krawit, E.L., Trowell, J., Albertini, S., Fesenstein, H. and Wright, R. (1981) HLA A and B locus antigens in patients with unexplained hepatitis following halothane anaesthesia. *Tissue antigens* **17**, 428-432.
- Edwards, R.J., Murray, B.P., Singleton, A.M. and Boobis, A.R. (1991) Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **30**, 71-76.
- Elfarra, A.A., Jakobson, I. and Anders, M.W. (1986) Mechanism of S-(1,2-dichlorovinyl) glutathione-induced nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 283-288.
- Engelhard, V.H. (1994) Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 13-23.
- Evavold, B.D. and Allen, P.M. (1991) Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science* **252**, 1308-1310.
- Evert, B., Grise, E.-U. and Eichelbaum, M. (1994a) Cloning and sequencing of a new non-functional *CYP2D6* allele: deletion of T1795 in exon 3 generates a premature stop codon. *Pharmacogenetics* **4**, 271-274.
- Evert, B., Grise, E.-U. and Eichelbaum, M. (1994b) A missense mutation in exon 6 of the *CYP2D6* gene leading to a histidine to proline exchange is associated with the poor metabolizer phenotype of sparteine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **350**, 434-439.
- Fabre, G., Julian, B., Saint-Aubert, B., Joyeux, H. and Berger, Y. (1993) Evidence for CYP3A-mediated N-deethylation of amiodarone in human liver microsomal fractions. *Drug Metab. Dispos.* **21**, 978-985.
- Franco, A., Barnaba, V., Natali, P., Balsano, C., Musca, A. and Balsano, F. (1987) Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes. *Hepatology* **8**, 449-454.
- Furuya, H., Fernandezsalguero, P., Gregory, W., Taber, H., Steward, A., Gonzalez, F.J. and Idle, J.R. (1995) Genetic polymorphism of CYP2C9 and its effect on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy. *Pharmacogenetics* **5**, 389-392.
- Gaedigk, A., Blum, M., Gaedigk, R., Eichelbaum, M. and Meyer, U.A. (1991) Deletion of the entire cytochrome P450 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 943-950.
- Garton, K.J., Yuen, P., Meinwald, J., Thummel, K.E. and Kharasch, E.D. (1995) Stereoselective metabolism of enflurane by human liver cytochrome P450 2E1. *Drug Metab. Dispos.* **23**, 1426-1430.
- Gautam, A.M., Lock, C.B., Smilek, D.E., Pearson, C.I., Steinman, L. and McDevitt, H.O. (1994) Minimum structural requirements for peptide presentation by major histocompatibility complex class II molecules: implications in induction of autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 767-771.
- Ged, C., Umbenhauer, D.R., Bellew, T.M., Bork, R.W., Srivastava, P.K., Shinriki, N., Lloyd, R.S. and Guengerich, F.P. (1988) Characterization of cDNAs, mRNAs, and proteins related to human liver microsomal cytochrome P-450 (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase. *Biochemistry* **27**, 6929-6940.
- George, J., Byth, K. and Farrell, G.C. (1995) Age but not gender selectively affects expression of individual cytochrome P450 proteins in human liver. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 727-730.

Références

- Germain, R. and Margulies, D.H. (1993) The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 403-450.
- Gibson, G.G. (1992) Co-induction of cytochrome P4504A1 and peroxisome proliferation: a causal or casual relationship? *Xenobiotica* **22**, 1101-1109.
- Gil, M.L., Ramirez, M.C., Terencio, M.C. and Castell, J.V. (1995) Immunochemical detection of protein adducts in cultured human hepatocytes exposed to diclofenac. *Biochim. Biophys. Acta* **1272**, 140-146.
- Goldman, M., Druet, P. and Gleichmann, E. (1991) Th2 cells in systemic autoimmunity: insight from allogeneic diseases and chemically-induced autoimmunity. *Immunol. Today* **12**, 223-227.
- Gomez-Lechon, M.J., Carrasquer, J., Berenguer, J. and Castell, J.V. (1996) Evidence of antibodies to erythromycin in serum of a patient following an episode of acute drug-induced hepatitis. *Clin. Exp. Allergy* **26**, 590-596.
- Gonzalez, F.J., Skoda, R.C., Kimura, S., Umeno, M., Zanger, U.M., Nebert, D.W., Gelboin, H.V., Hardwick, J.P. and Meyer, U.A. (1988) Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* **331**, 442-446.
- Gonzalez, F.J., Liu, S.Y. and Yano, M. (1993) Regulation of cytochrome P450 genes: molecular mechanisms. *Pharmacogenetics* **3**, 51-57.
- Green, V.J., Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., Gaedigk, A., Grant, D.M., Boxer, M., Burchell, B. and Park, B.K. (1995) Genetic analysis of microsomal epoxide hydrolase in patients with carbamazepine hypersensitivity. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1353-1359.
- Griem, P. and Gleichmann, E. (1995) Metal ion induced autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 831-838.
- Griem, P., Panthel, K., Kalbacher, H. and Gleichmann, E. (1996) Alteration of a model antigen by Au(III) leads to T cell sensitization to cryptic peptides. *Eur. J. Immunol.* **26**, 279-287.
- Gruenke, L.D., Konopka, D.R., Koop, D.R. and Waskell, L.A. (1988) Characterization of halothane oxidation by hepatic microsomes and purified cytochrome P450 using a gas chromatographic mass spectrometric assay. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **246**, 454-459.
- Guengerich, F.P., Martin, M.V., Beaune, P., Kremers, P., Wolf, T. and Waxman, D.J. (1986a) Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* **261**, 5051-5060.
- Guengerich, F.P., Müller-Enoch, D. and Blair, I.A. (1986b) Oxidation of quinidine by human liver cytochrome P450. *Mol. Pharmacol.* **30**, 287-295.
- Guengerich, F.P. (1990) Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P-450 3A4 by gestodene. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 363-371.
- Guengerich, F.P. (1991a) Reactions and significance of P450 enzymes. *J. Biol. Chem.* **266**, 10019-10022.
- Guengerich, F.P., Brian, W.R., Sari, M.-A. and Ross, J.T. (1991b) Expression of mammalian cytochrome P-450 enzymes using yeast-based vectors *Methods in Enzymology*, (Ed.), pp 130-145.

Références

- Guengerich, F.P., Gillam, E.M.J., Martin, M.V., Baba, T., Kim, B.R., Shimada, T., Raney, K.D. and Yun, C.H. (1994) The importance of cytochrome P450 3A enzymes in drug metabolism *Schering Foundation Workshop, assessment of the use of single cytochrome P450 enzymes in drug research*, Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp 161-186.
- Guengerich, F.P. (1995) Human P450s *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, (de Montellano, P.R.O. Ed.), Plenum Press, New York, pp 477-535.
- Gunaratnam, N.T., Benson, J., Gandolfi, A.J. and Chen, M.L. (1995) Suspected isoflurane hepatitis in an obese patient with a history of halothane hepatitis. *Anesthesiology* **83**, 1361-1364.
- Gut, J., Christen, U., Frey, N., Koch, V. and Stoffler, D. (1995) Molecular mimicry in halothane hepatitis: biochemical and structural characterization of lipoylated autoantigens. *Toxicology* **97**, 199-224.
- Guzov, V.M., Zelko, I.N., Bylinskaya, S.A. and Usanov, S.A. (1994) Structural and functional characterization of cytochrome P450c21: Immunochemical approach and limited proteolysis. *Biochemistry - Moscow* **59**, 859-869.
- Halpert, J.R. (1981) Covalent modification of lysine during the suicide inactivation of rat liver cytochrome P-450 by chloramphenicol. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 875-881.
- Halpert, J.R., Guengerich, F.P., Bend, J.R. and Correia, M.A. (1994) Contemporary issues in toxicology. Selective inhibitors of cytochromes P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **125**, 163-175.
- Halpert, J.R. (1995) Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 29-53.
- Hargus, S.J., Amouzedeh, H.R., Pumford, N.R., Myers, T.G., McCoy, S.C. and Pohl, L.R. (1994) Metabolic activation and immunochemical localization of liver protein adducts of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 575-582.
- Hasemann, C.A., Ravichandran, K.G., Peterson, J.A. and Deisenhofer, J. (1994) Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3Å resolution. *J. Mol. Biol.* **236**, 1169-1185.
- Haurand, M. and Ullrich, V. (1985) Isolation and characterization of thromboxane synthase from human platelets as a cytochrome P450 enzyme. *J. Biol. Chem.* **260**, 325-330.
- He, K., Falick, A.M., Chen, B.L., Nilsson, F. and Correia, M.A. (1996) Identification of the heme adduct and an active site peptide modified during mechanism-based inactivation of rat liver cytochrome P450 2B1 by secobarbital. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 614-622.
- Heijink, E., De Matteis, F., Gibbs, A.H., A., D. and H., W.I.N. (1993) Metabolic activation of halothane to neoantigens in C57B1/10 mice: immunochemical studies. *Eur. J. Pharmacol.* **248**, 15-25.
- Hinson, J.A., Pumford, N.R. and Roberts, D.W. (1995) Mechanisms of acetaminophen toxicity: immunochemical detection of drug-protein adducts. *Drug Metab. Rev.* **27**, 73-92.
- Holtzman, J.L. (1995) The role of covalent binding to microsomal proteins in the hepatotoxicity of acetaminophen. *Drug Metab. Rev.* **27**, 277-297.
- Homberg, J.C., André, C. and Abuaf, N. (1984) A new anti-Liver Kidney Microsome antibody (anti-LKM₂) in tienilic acid-induced hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **55**, 561-570.

Références

- Homberg, J.C., Abuaf, N., Helmy-Khalil, S., Biour, M., Poupon, R., Islam, S., Darnis, F., Levy, V.G., Opolon, P., Beaugrand, M., Toulet, J., Danan, J. and Benhamou, J.P. (1985) Drug-induced hepatitis associated with anticytoplasmic organelle autoantibodies. *Hepatology* **5**, 722-727.
- Horsmans, Y. (1993) Hépatites aiguës d'origine médicamenteuse. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **17**, 25-30.
- Huwlyer, J., Aeschlimann, D., Christen, U. and Gut, J. (1992a) The kidney as a novel target tissue for protein adduct formation associated with metabolism of halothane and the candidate chlorofluorocarbon replacement 2,2-dichloro-1,1,1-trifluoroethane. *Eur. J. Biochem.* **207**, 229-238.
- Huwlyer, J. and Gut, J. (1992b) Exposure to the chlorofluorocarbon substitute 2,2-dichloro 1,1,1-trifluoroethane and the anesthetic agent halothane is associated with transient protein adduct formation in the heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1344-1349.
- Idle, J.R., Mahgoub, A., Lancaster, R. and Smith, R.L. (1978) Hypotensive response to debrisoquine and hydroxylation phenotype. *Life Sci.* **22**, 979-984.
- Jaeger, R.J., Conolly, R.B. and Murphy, S.D. (1974) Effect of 18 hr fast and glutathione depletion on 1,1-dichloroethylene-induced hepatotoxicity and lethality in rats. *Exp. Mol. Pathol.* **20**, 187-198.
- Janeway Jr., C.A. and Bottomly, K. (1994) Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* **76**, 275-285.
- Jenkins, M.K., Ashwell, J.D. and Schwartz, R.H. (1988) Allogeneic non-T spleen cells restore the responsiveness of normal T cells clones stimulated with antigen and chemically modified antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **140**, 3324-3330.
- Jin, L., Baillie, T.A., Davis, M.R. and Kharasch, E.D. (1995) Nephrotoxicity of sevoflurane compound A [fluoromethyl-2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl)vinyl ether] in rats: evidence for glutathione and cysteine conjugate formation and the role of renal cysteine conjugate β -lyase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 498-506.
- Johansson, I., Lundquist, E., Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjoqvist, F. and Ingelman-Sundberg, M. (1993) Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 11825-11829.
- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Zinkernagel, R.M. and Hengartner, H. (1996) Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis *in vivo*. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 207-232.
- Kagimoto, M., Heim, M., Kagimoto, K., Zeugin, T. and Meyer, U.A. (1990) Multiple mutations of the human cytochrome P450D6 gene (CYP2D6) in poor poor metabolisers of debrisoquine. *J. Biol. Chem.* **265**, 17209-17214.
- Kato, H., Enoki, M., Takashima, T., Ohmori, K. and Sunaga, T. (1996) Anaphylactic reaction induced by diclofenac. *Tohoku J. Exp. Med.* **179**, 55-59.
- Kedderis, G.L. (1996) Biochemical basis of hepatocellular injury. *Toxicologic Pathology* **24**, 77-83.
- Keeney, D.S. and Waterman, M.R. (1993) Regulation of steroid hydroxylase gene expression: importance to physiology and disease. *Pharmacol. Ther.* **58**, 301-317.

Kenna, J.G., Neuberger, J. and Williams, R. (1987) Identification by immunoblotting of three halothane-induced liver microsomal polypeptide antigens recognized by antibodies in sera from patients with halothane-associated hepatitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **242**, 733-740.

Kenna, J.G., Satoh, H., Christ, D. and Pohl, L.R. (1988) Metabolic basis for a drug hypersensitivity: antibodies in sera from patients with halothane hepatitis recognize liver neoantigens that contain the trifluoroacetyl group derived from halothane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**, 1103-1109.

Kenna, J.G., Martin, J.L., Satoh, H. and Pohl, L.R. (1990) Factors affecting the expression of trifluoroacetylated protein neoantigens in rats treated with halothane. *Drug Metab. Dispos.* **18**, 788-793.

Kenna, J.G., Martin, J.L. and Pohl, L.R. (1992) The topography of trifluoroacetylated protein antigens in liver microsomal fractions from halothane treated rats. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 621-629.

Kenna, J.G. and Jones, R.M. (1995) The organ toxicity of inhaled anesthetics. *Anesth. Analg.* **81**, S51-S66.

Kerr, B.M., Rettie, A.E. and Eddy, C. (1989) Inhibition of human liver microsomal epoxide hydrolase by valproate and valpromide: in vitro/in vivo correlation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **46**, 82-93.

Kerr, B.M., Thummel, K.E., Wurden, C.J., Klein, S.M., Kroetz, D.L., Gonzalez, F.J. and Levy, R.H. (1994) Human liver carbamazepine metabolism. Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1969-1979.

Kersh, G.J. and Allen, P.M. (1996) Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature* **380**, 495-498.

Kharasch, E.D. and Thummel, K.E. (1993) Identification of cytochrome P4502E1 as the predominant enzyme catalysing human liver microsomal defluorination of sevoflurane, isoflurane and methoxyflurane. *Anesthesiology* **79**, 795-807.

Kharasch, E.D., Hankins, D., Mautz, D. and Thummel, K.E. (1996) Identification of the enzyme responsible for oxidative halothane metabolism: Implications for prevention of halothane hepatitis. *Anesthesiology* **347**, 1367-1371.

Kimura, S., Pastweka, J., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J. (1987) cDNA and amino acid sequences of two members of the human P450IIC gene subfamily. *Nucl. Acids Res.* **15**, 10053-10054.

Knight, T.L., Scatchard, K.M., Vanpelt, F.N.A.M. and Kenna, J.G. (1994) Sera from patients with halothane hepatitis contain antibodies to halothane-induced liver antigens which are not detectable by immunoblotting. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 1325-1333.

Kraner, J.C., Morgan, E.T. and Halpert, J.R. (1994) Selective suppression of rat hepatic cytochrome p450 2C11 by chloramphenicol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 1367-1372.

Kremers, P., Beaune, P., Cresteil, T., De Graeve, J., Columelli, S., Leroux, J.P. and Gielen, J.E. (1981) Cythochrome P-450 monooxygenases activities in human and rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.* **118**, 599-606.

Kretz-Rommel, A. and Boelsterli, U.A. (1993) Diclofenac covalent protein binding is dependent on acyl glucuronide formation and is inversely related to P450-mediated acute cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120**, 155-161.

- Kretz-Rommel, A. and Boelsterli, U.A. (1994a) Mechanism of covalent adduct formation of diclofenac to rat hepatic microsomal proteins - retention of the glucuronic acid moiety in the adduct. *Drug Metab. Dispos.* **22**, 956-961.
- Kretz-rommel, A. and Boelsterli, U.A. (1994b) Selective Protein Adducts to Membrane Proteins in Cultured Rat Hepatocytes Exposed to Diclofenac - Radiochemical and Immunochemical Analysis. *Mol. Pharmacol.* **45**, 237-244.
- Kretz-Rommel, A. and Boelsterli, U.A. (1995) Cytotoxic activity of T cells and non-T cells from diclofenac-immunized mice against cultured syngeneic hepatocytes exposed to diclofenac. *Hepatology* **22**, 213-222.
- Krynetskii, E.Y. (1996) Polymorphism of drug-metabolizing enzymes: Gene structure and enzyme activity (a review). *Mol. Biol.* **30**, 17-23.
- Kunze, K.L. and Trager, W.F. (1993) Isoform-selective mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A2 by furafylline. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 649-656.
- Labbe, G., Descatoire, V., Beaune, P., Lettéron, P., Larrey, D. and Pessayre, D. (1989) Suicide inactivation of cytochrome P-450 by methoxsalen. Evidence for the covalent binding of a reactive intermediate to the protein moiety. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**, 1034-1042.
- Laethem, R.M., Balazy, M. and Koop, D.R. (1996) Epoxidation of C-18 unsaturated fatty acids by cytochromes P4502C2 and and P4502CAA. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 664-668.
- Laman, J.D., Claassen, E. and Noelle, R.J. (1996) Functions of CD40 and its Ligand, gp39 (CD40L). *Crit. Rev. Immunol.* **16**, 59-108.
- Larrey, D. (1995) Hépatites aiguës médicamenteuses. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **19**, 57-62.
- Lecoeur, S., Bonierbale, E., Challine, D., Gautier, J.-C., Valadon, P., Dansette, P.M., Catinot, R., Ballet, F., Mansuy, D. and Beaune, P. (1994) Specificity of in vitro covalent binding of tienilic acid metabolites to human liver microsomes in relationship to the type of hepatotoxicity: comparison with two directly hepatotoxic drugs. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 434-442.
- Lecoeur, S., Andre, C. and Beaune, P.H. (1996) Tienilic acid-induced autoimmune hepatitis: Anti-liver and -kidney microsomal type 2 autoantibodies recognize a three-site conformational epitope on cytochrome P4502C9. *Mol. Pharmacol.* **50**, 326-333.
- Leeder, J.S., Riley, R.J., Cook, V.A. and Spielberg, S.P. (1992) Human anti-cytochrome P450 antibodies in aromatic anticonvulsant-induced hypersensitivity reactions. **263**, 360-367.
- Leemann, T.D., Transon, C., Bonnabry, P. and Dayer, P. (1993) A major role for cytochrome P450TB (CYP2C subfamily) in the actions of non-steroidal antiinflammatory drugs. *Drugs Exp. Clin. Res.* **19**, 189-195.
- Leemann, T.D., Transon, C. and Dayer, P. (1992) Cytochrome P450tb (CYP2C): a major monooxygenase catalysing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. **52**, 29-34.
- Lemoine, A., Gautier, J.C., Azoulay, D., Guengerich, F.P., Beaune, P., Maurel, P. and Leroux, J.P. (1993) The major pathway of imipramine metabolism is catalysed by cytochrome P450 1A2 and P450 3A4 in human liver. *Mol. Pharmacol.* **43**, 827-832.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L. and Bluestone, J.A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 233-258.

Références

- Levron, J.C., Le Fur, J.M., Adnot, P. and Dormard, Y. (1977) Pharmacokinetic study of 2,3-dichloro-4-(2-thienylketo¹⁴C) phenoxyacetic acid. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacol.* **3**, 107-115.
- Levy, R.H. (1995) Cytochrome P450 isosymes and antiepileptic drug interactions. *Epilepsia* **36**, S8-S13.
- Lillibridge, J.H., Amore, B.M., Slattery, J.T., Kalhorn, T.F., Nelson, S.D., Finnel, R.H. and Bennett, G.D. (1996) Protein-reactive metabolites of carbamazepine in mouse liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 509-514.
- Liu, Y. and Linsley, P.S. (1992) Costimulation of T-cell growth. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 265-270.
- Loeper, J., Descatoire, V., Maurice, M., Beaune, P., Belghiti, J., Houssin, D., Ballet, F., Feldmann, G., Guengerich, F.P. and Pessayre, D. (1993) Cytochromes P-450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autoantibodies. *Gastroenterology* **104**, 203-216.
- Lopez-Garcia, P., Dansette, P.M., Valadon, P., Amar, C., Beaune, P., Guengerich, F.P. and Mansuy, D. (1993) Human liver cytochromes P-450 expressed in yeast as tools for reactive -metabolite formation studies: oxidative activation of tienilic acid by cytochromes P-450 2C9 and 2C10. *Eur. J. Biochem.* **213**, 223-232.
- Lopez-Garcia, P., Dansette, P. and Mansuy, D. (1994) Thiophene derivatives as a new mechanism-based inhibitors of cytochromes P-450: inactivation of yeast-expressed human liver cytochrome P-450 2C9 by tienilic acid. *Biochemistry* **33**, 166-175.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. (1991) The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* **353**, 321-325.
- Madden, S., Woolf, T.F., Pool, W.F. and Park, B.K. (1995) Species variation in the activation of tacrine by hepatic microsomes. *Xenobiotica* **25**, 103-116.
- Madden, S., Maggs, J.L. and Park, B.K. (1996) Bioactivation of carbamazepine in the rat in vivo - Evidence for the formation of reactive arene oxide(s). *Drug Metab. Dispos.* **24**, 469-479.
- Maggs, J.L., Williams, D., Pirmohamed, M. and Park, B.K. (1995) The metabolic formation of reactive intermediates from clozapine, a drug associated with agranulocytosis in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**, 1463-1475.
- Manautou, J.E., Hoivik, D.J., Tveit, A., Hart, S.G.E., Khairallah, E.A. and Cohen, S.D. (1994) Clofibrate pretreatment diminishes acetaminophen's selective covalent binding and hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **129**, 252-263.
- Mansuy, D., Dansette, P.M., Foures, C., Jaouen, M., Moinet, G. and Bayer, N. (1984) Metabolic hydroxylation of the thiophene ring: isolation of 5-hydroxy-tienilic acid as the major urinary metabolite of tienilic acid in man and rat. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1429-1435.
- Mansuy, D., Valadon, P., Erdelmeier, I., Lopez-Garcia, P., Amar, C., Girault, J.P. and Dansette, P.M. (1991) Thiophene S-oxides as new reactive metabolites: formation by cytochrome P450 dependent oxidation and reaction with nucleophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7825-7826.

Références

- Mansuy, D. and Battioni, P. (1993) Dioxygen activation at heme centers in enzymes and synthetic analogs *Bioinorganic catalysis*, (Reedijk, J. Ed.), Dekker, New York, pp 395-424.
- Mansuy, D. (1994) Cytochromes P-450 and model Systems- great diversity of catalysed reactions. *Pure Appl. Chem.* **66**, 737-744.
- Martin, J.L., Kenna, J.G. and Pohl, L.R. (1990) Antibody assays for the detection of patients sensitized to halothane. *Anesth. Analg.* **70**, 154-159.
- Martin, J.L., Pumford, N.R., LaRosa, A.C., Martin, B.M., Gonzaga, H.M.S., Beaven, M.A. and Pohl, L.R. (1991) A metabolite of halothane covalently binds to endoplasmic reticulum protein that is highly homologous to phosphatidylinositol-specific phospholipase C- α but has no activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 679-685.
- Martin, J.L., Kenna, J.G., Martin, B.M., Thomassen, D., Reed, G.F. and Pohl, L.R. (1993a) Halothane hepatitis patients have serum antibodies that react with protein disulfide isomerase. *Hepatology* **18**, 858-863.
- Martin, J.L., Reed, G.F. and Pohl, L.R. (1993b) Association of anti-58 kDa endoplasmic reticulum antibodies with halothane hepatitis. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1247-1250.
- Martin, J.L., Plevak, D.J., Flanery, K.D., Charlton, M., Poterucha, J.J., Humphreys, C.E., Derfus, G. and Pohl, L.R. (1995) Hepatotoxicity after desflurane anesthesia. *Anesthesiology* **83**, 1125-1129.
- Maser, E., Gebel, T. and Netter, K.J. (1991) Carbonyl reduction of metyrapone in human liver. *Biochem. Pharmacol.* **42**, S93-S98.
- Mauri-Hellweg, D., Bettens, F., Mauri, D., Brander, C., Hunziker, T. and Pichler, W.J. (1995) Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine. *J. Immunol.* **155**, 462-472.
- McConkey, D.J., Hartzell, P., Nicotera, P., Wyllie, A.H. and Orrenius, S. (1988) Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol. Lett.* **42**, 123-130.
- McManus, M.E., Burgess, W.M., Veronese, M.E., Huggett, A., Quattrochi, L.C. and Tukey, R.H. (1990) Metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochromes P-450. *Cancer Res.* **50**, 3367-3376.
- Mehendale, H.M., Roth, R.A., Gandolfi, A.J., Klaunig, J.E., Lemasters, J.J. and Curtis, L.R. (1994) Novel mechanisms in chemically induced hepatotoxicity. *FASEB J.* **8**, 1285-1295.
- Meister, A. and Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.
- Miner, D.J. and Kissinger, P.T. (1979) Evidence for the involvement of *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine in acetaminophen metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 3285-3290.
- Molowa, D.T., Schuetz, E.G., Wrighton, S.A., Watkins, P.B., Kremers, P., Mendez-Picon, G., Parker, G.A. and Guzelian, P.S. (1986) Complete cDNA sequence of a cytochrome P-450 inducible by glucocorticoids in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 5311-5315.
- Moody, D.E., Taylor, L.A. and Smucker, E.A. (1985) Immunofluorescent determination of the lobular distribution of a constitutive form of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Hepatology* **5**, 440-451.

Références

- Morel, P., Beaune, P., Ratanasavanh, D., Finois, J.P., Yang, C.S., Guengerich, F.P. and Guillouzo, A. (1990) Expression of cytochrome P-450 enzymes in cultured human hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **191**, 437-444.
- Mortimer, Ö., Lindström, B., Laurell, H., Bergman, U. and Rane, A. (1989) Dextromethorphan: polymorphic serum pattern of the O-demethylated and didemethylated metabolites in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **27**, 223-227.
- Murray, M. and Reidy, G.F. (1990) Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P450 by chemical agents. *Pharmacol. Rev.* **42**, 85-101.
- Murray, M. and Butler, A.M. (1995) Identification of a reversible component in the in vitro inhibition of rat hepatic cytochrome P450 2B1 by parathion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**, 639-644.
- Murray, M., Butler, A.M. and Agus, C. (1996) Restoration of cytochrome P450 2C11 in vitamin A-deficient rat liver by exogenous androgen. *FASEB J.* **10**, 1058-1063.
- Nakamura, K., Goto, F., Ray, W.A., McAllister, C.B., Jacqs, E., Wilkinson, G.R. and Branch, R.A. (1985) Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin. Pharmacol. Ther.* **38**, 402-408.
- Nataf, J., Bernuau, J., Larrey, D., Guillin, M.C., Rueff, B. and Benhamou, J.-P. (1986) A new anti-liver microsome antibody: a specific marker of dihydralazine-induced hepatitis. *Gastroenterology* **90**, 1751.
- Neau, E. (1989) Oxydation hépatique des dérivés du thiophène : enzymes impliquées et réactions biomimétiques. Paris V.
- Neau, E., Dansette, P.M., Andronik, V. and Mansuy, D. (1990) Hydroxylation of the thiophene ring by hepatic monooxygenases: evidence for 5-hydroxylation of 2-arylthiophenes as a general metabolic pathway using a simple UV-visible assay. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1101-1107.
- Nebert, D.W., Petersen, D.D. and Fornace, A.J. (1990) Cellular responses to oxidative stress: the Ah gene battery as a paradigm. *Environ. Health Perspect.* **88**, 13-25.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R. and Waxman, D.J. (1991) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* **10**, 1-14.
- Nebert, D.W. (1994) Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 25-37.
- Nelson, S.D. (1995) Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. *Drug Metabolism Reviews* **27**, 147-177.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. and Nebert, D.W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.
- Nicotera, P., Bellomo, G. and Orrenius, S. (1990) The role of Ca²⁺ in cell killing. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 484-494.

- Nugonbaudon, L., Roland, N., Flinois, J.P. and Beaune, P. (1996) Hepatic cytochrome p450 and UDP-glucuronosyl transferase are affected by five sources of dietary fiber in germ-free rats. *J. Nutriti* **126**, 403-409.
- Okey, A.B. (1990) Enzyme induction in the cytochrome P450 system. *Pharmacol. Ther.* **45**, 241-298.
- Omura, T. and Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378.
- Paine, A.J. (1995) Heterogeneity of cytochrome P450 and its toxicological significance. *Hum. Exp. Toxicol.* **14**, 1-7.
- Pampori, N.A. and Shapiro, B.H. (1994) Over-expression of CYP2C11, the major male-specific form of hepatic cytochrome p450, in the presence of nominal pulses of circulating growth hormone in adult male rats neonatally exposed to low levels of monosodium glutamate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 1067-1073.
- Park, B.K., Pirmohamed, M., Tingle, M.D., Madden, S. and Kitteringham, N.R. (1994) Bioactivation and bioinactivation of drugs and drug metabolites: relevance to adverse drug reactions. *Toxicol. in Vitro* **8**, 613-621.
- Park, B.K., Pirmohamed, M. and Kitteringham, N.R. (1995) The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol. Ther.* **68**, 385-424.
- Park, B.K., Kitteringham, N.R., Pirmohamed, M. and Tucker, G.T. (1996) Relevance of induction of human drug-metabolizing enzymes: Pharmacological and toxicological implications. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **41**, 477-491.
- Patten, C.J., Thomas, P.E., Guy, R.L., Lee, M., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P. and Yang, C.S. (1993) Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 511-548.
- Pessayre, D. (1995) Mécanismes des hépatites médicamenteuses. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **19**, 47-56.
- Peter, R., Böcker, R.G., Beaune, P., Iwasaki, M., Guengerich, F.P. and Yang, C.-S. (1990) Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P450 2E1. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 566-573.
- Pike, S.F., Shepard, E.A., Rabin, B.R. and Phillips, I.R. (1985) Induction of cytochrome P450 by phenobarbital is mediated at the level of transcription. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 711-719.
- Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., Breckenridge, A.M. and Park, B.K. (1992) Detection of an autoantibody directed against human liver microsomal protein in a patient with carbamazepine hypersensitivity. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **33**, 183-186.
- Ploemen, J.H.T.M., Van Ommen, B., Bogaards, J.J.P. and Van Bladeren, P.J. (1993) Ethacrynic acid and its glutathione conjugate as inhibitors of glutathione S-transferases. *Xenobiotica* **23**, 913-923.
- Ploemen, J.P.H.T.M., Vaniersel, M.L.P.S., Wormhoudt, L.W., Commandeur, J.N.M., Vermeulen, N.P.E. and Vanbladeren, P.J. (1996) In vitro inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by disulfiram and diethyldithiocarbamate. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 197-204.

Références

- Podevin, P. and Biour, M. (1995) Drug-induced "allergic hepatitis". *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **13**, 223-244.
- Pohl, L.R. (1979) Biochemical toxicology of chloroform *Reviews of biochemical toxicology*, (Bend, J., Philpot, R. and Hogson, E. Ed.), Elsevier, Amsterdam.
- Pohl, L.R., Branchflower, R.V. and Highet, R.J. (1981) The formation of diglutathionyl dithiocarbamate as a metabolite of chloroform, bromotrichloromethane, and carbon tetrachloride. *Drug Metab. Dispos.* **9**, 333-339.
- Pohl, L.R. (1993) An immunochemical approach of identifying and characterizing protein targets of toxic reactive metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 786-793.
- Pondosa, X., Bort, R., Jover, R., Gomez-Lechon, M.J. and Castell, J.V. (1995) Molecular mechanism of diclofenac hepatotoxicity: association of cell injury with oxidative metabolism and decrease in ATP levels. *Toxicol. in Vitro* **9**, 439-444.
- Pons, C. (1989) Origine des anticorps anti-tissus apparaissant dans des hépatites médicamenteuses de type immuno-allergique. Paris VII.
- Pons, C., Dansette, P.M., Amar, C., Jaouen, M., Wolf, R., Gregeois, J., Homberg, J.C. and Mansuy, D. (1991) Detection of human hepatitis anti-Liver Kidney Microsomes (LKM₂) Autoantibodies on rat liver sections is predominantly due to reactivity with rat liver P-450 2C11. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **259**, 1328-1334.
- Porter, T.D. and Coon, M.J. (1991) Cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* **266**, 13469-13472.
- Poulos, T.L., Finzel, B.C., Gunsalus, I.C., Wagner, G.C. and Kraut, J. (1985) The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **260**, 16122-16130.
- Poulos, T.L., Finzel, B.C. and Howard, A.J. (1986) Crystal structure of substrate-free *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Biochemistry* **25**, 5314-5322.
- Poupon, R., Homberg, J.-C., Abuaf, N., Petit, J., Bodin, F. and Darnis, F. (1980) Ateintes hépatiques dues à l'acide tiénilique. Six observations avec présence d'anticorps antiréticulum endoplasmique. *Nouv. Presse Méd.* **9**, 1881-1884.
- Prigent, P., Saourdi, A., Pannetier, C., Graber, P., Bonnefoy, J.-Y. and Druet, P. (1995) Mercuric chloride, a chemical responsible for Th2-mediated autoimmunity in Brown Norway rats, directly triggers T cells to produce IL-4. *J. Clin. Invest.* **96**, 1481-1489.
- Pumford, N.R., Martin, B.M., Thomassen, D., Burris, J.A., Kenna, J.G., Martin, J.L. and Pohl, L.R. (1993) Serum Antibodies from Halothane Hepatitis Patients React with the Rat Endoplasmic Reticulum Protein ERp72. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 609-615.
- Quaratino, S., Thorpe, C.J., Travers, P.J. and Londei, M. (1995) Similar antigenic surfaces, rather than sequence homology, dictate T-cell epitope molecular mimicry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 10398-10402.
- Rafeiro, E., Barr, S.G., Harrison, J.J. and Racz, W.J. (1994) Effects of N-acetylcysteine and dithiothreitol on glutathione and protein thiol replenishment during acetaminophen-induced toxicity in isolated mouse hepatocytes. *Toxicology* **93**, 209-224.
- Rahman, A., Korzekwa, K.R., Grogan, J., Gonzalez, F.J. and Harris, J.W. (1994) Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome p450 2C8. *Cancer Res.* **54**, 5543-5546.

Références

- Rammensee, H.-G., Kirsten, F. and Rötzschke, O. (1993) Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 213-244.
- Rao, M.S. and Reddy, J.K. (1991) An overview of peroxisome proliferator -induced hepatocarcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **93**, 205-209.
- Ravichandran, K.G., Boddupalli, S.S., Hasemann, C.A., Peterson, J.A. and Deisenhofer, J. (1993) Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* **261**, 731-736.
- Ray, S.D., Sorge, C.L., Raucy, J.L. and Corcoran, G.B. (1990) Early loss of large genomic DNA in vivo with accumulation of Ca^{2+} in the nucleus during acetaminophen -induced liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **106**, 346-351.
- Reed, D.J. (1990) Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 495-502.
- Relling, M.V., Cherrie, J., Schell, M.J., Petros, W.P., Meyer, W.H. and Evans, W.E. (1991) Lower prevalence of the debrisoquin oxidative poor metabolizer phenotype in American black versus white subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **50**, 308-313.
- Renaud, J.P., Cullin, C., Pompon, D., Beaune, P. and Mansuy, D. (1990) Expression of human liver cytochrome P450 3A4 in yeast: a functional model for the hepatic enzyme. *Eur. J. Biochem.* **194**, 889-896.
- Rettie, A.E., Wienkers, L.C., Gonzalez, F.J., Trager, W.F. and Korzekwa, K.R. (1994) Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics* **4**, 39-42.
- Riley, R.J., Smith, G., Wolf, C.R., Cook, V.A. and Leeder, J.S. (1993) Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies produced in aromatic anticonvulsant hypersensitivity reactions recognise rodent CYP3A proteins and a similarly regulated human P450 enzyme(s). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 32-40.
- Riley, R.J. and Leeder, J.S. (1995) In vitro analysis of metabolic predisposition to drug hypersensitivity reactions. *Clin. Exp. Immunol.* **99**, 1-6.
- Robin, M.-A., Maratrat, M., Le Roy, M., Le Breton, F.-P., Bonierbale, E., Dansette, P., Ballet, F., Mansuy, D. and Pessayre, D. (1996) Antigenic targets in tienilic acid hepatitis. Both cytochrome P450 2C11 and 2C11-tienilic acid adducts are transported to the plasma membrane of rat hepatocytes and recognized by human sera. *J. Clin. Invest.* **98**, 1471-1480.
- Roitt, I. (1994) *Essential immunology 8th Edition*, (Science, B. Ed.), Oxford.
- Roman, L.J., Palmer, C.N.A., Clark, J.E., Muerhoff, A.S., Griffin, K.J., Jonhson, E.F. and Masters, B.S.S. (1993) Expression of rabbit cytochromes P4504A which catalyse the ω -hydroxylation of arachidonic acid, fatty acids, and prostaglandins. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 57-65.
- Romkes, M., Faleto, M.B., Blaisdell, J.A., Raucy, J.L. and Goldstein, J.A. (1991) Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily. *Biochemistry* **30**, 3247-3255.
- Ronis, M.J., Huang, J., Crouch, J., Mercado, C., Irby, D., Valentine, C.R., Lumpkin, C.K., Ingelman-Sundberg, M. and Badger, T.M. (1993) Cytochrome P450 CYP 2E1 induction during chronic alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol concentration in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**, 944-950.

Références

- Roschlau, G. (1986) Virushepatitis gegen Arzneimittelhepatitis. *Z. Klin. Med.* **41**, 817-819.
- Röttschke, O. and Falk, K. (1994) Origin, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 45-51.
- Saoudi, A., Castedo, M., Nochy, D., Mandet, R., Druet, P. and Pelletier, L. (1995) Self reactive anti-class II Th2 cell lines derived from gold salt-injected rats trigger B cell polyclonal activation and transfer autoimmunity in CD8-depleted normal syngeneic recipients. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1972-1979.
- Satoh, H., Fukuda, Y., Anderson, D.K. and al., e. (1985) Immunological studies on the mechanism of halothane-induced hepatotoxicity: immunohistochemical evidence of trifluoroacetylated hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **233**, 857-862.
- Satoh, H., Martin, B.M., Schulick, A.H., Christ, D.D., Kenna, J.G. and Pohl, L.R. (1989) Human anti-endoplasmic reticulum antibodies in sera of patients with halothane-induced hepatitis are directed against a trifluoroacetylated carboxylesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 322-326.
- Saxena, R., Shaw, G.L., Relling, M.V., Frame, J.N., Moir, D.T., Evans, W.E., Caporaso, N. and Weiffenbach, B. (1994) Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 923-926.
- Schneider, T., Zschiesche, M., Siegmund, W., Krüger, R. and Kallwellis, R. (1989) Beziehungen zwischen N-Acetylierungspolymorphismus und Dihydralazinmetabolismus. *Z. Klin. Med.* **44**, 219-220.
- Seeman, P. (1972) The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.* **24**, 583-655.
- Sercarz, E.E., Lehmann, P.V., Ametani, A., Benichou, G., Miller, A. and Moudgil, K. (1993) Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 729-766.
- Shear, N.H. and Spielberg, S.P. (1988) Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. *J. Clin. Invest.* **82**, 1826-1832.
- Shen, W., Kamendulis, L.M., Ray, S.D. and Corcoran, G.B. (1992) Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: effects of Ca²⁺ endonuclease, DNA repair, and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation and cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **112**, 32-40.
- Shimada, T., Misono, K.S. and Guengerich, F.P. (1986) Human liver microsomal cytochrome P450 mephenytoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. Purification and characterization of two similar forms involved in the reaction. *J. Biol. Chem.* **261**, 909-921.
- Simmons, D.L., McQuiddy, P. and Kasper, C.B. (1987) Induction of hepatic mixed-function oxidase system by synthetic glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* **262**,
- Simon, I., Berthou, F., Riche, C., Beaune, P. and Ratanasavahn, D. (1993) Both cytochrome P4501A and 3A4 are involved in the N-demethylation of tamoxifen. *Abstracts, 5th European ISSX Meeting (September 26-29, Tours)* **3**, 44.
- Sinigaglia, F. and Hammer, J. (1994) Defining rules for the peptide-MHC class II interaction. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 52-56.

- Sipes, I.G. and Brown, B.R., Jr. (1976) An animal model of hepatotoxicity associated with halothane anesthesia. *Anesthesiology* **45**, 622-628.
- Smith, T.E., Weissbach, H. and Udenfriend, S. (1963) Studies on monoamine oxidase: the mechanism of inhibition of monoamine oxidase by iproniazid. *Biochemistry* **2**, 746-751.
- Spina, E., Pisani, F. and Perucca, E. (1996) Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with carbamazepine. *Clin. Pharmacokinet.* **31**, 198-214.
- Spracklin, D.K. and Kharasch, E.D. (1996) Evidence for metabolism of fluoromethyl 2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl)vinyl ether (Compound A), a sevoflurane degradation product, by cysteine conjugate beta-lyase. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 696-702.
- Srivastava, P.K., Yun, C.H., Beaune, P.H., Ged, C. and Guengerich, F.P. (1991) Separation of human liver microsomal tolbutamide hydroxylase and (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase cytochrome P-450 enzymes. *Mol. Pharmacol.* **40**, 69-79.
- Stogniew, M. and Fenselau, C. (1982) Electrophilic reactions of acyl-linked glucuronides: formation of clofibrate mercapturate in humans. *Drug Metab. Dispos.* **10**, 609-613.
- Stricker, B.H.C. and Spoelstra, P. (1985) *Drug-induced liver injury*, Ed.), Elsevier, Amsterdam.
- Sullivanklose, T.H., Ghanayem, B.I., Bell, D.A., Zhang, Z.Y., Kaminsky, L.S., Shenfield, G.M., Miners, J.O., Birkett, D.J. and Goldstein, J.A. (1996) The role of the CYP2C9-Leu(359) allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* **6**, 341-349.
- Szczesna-Skorupa, E., Ahn, K., Chen, C.-D., Doray, B. and Kemper, B. (1995) The cytoplasmic and N-terminal transmembrane domains of cytochrome P450 contain independent signals for retention in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**, 24327-24333.
- Ternynck, T. and Avrameas, S. (1987) *Techniques immuno-enzymatiques*, Les Editions INSERM, Paris.
- Thomassen, D., Martin, B.M., Martin, J.L. and al., e. (1990) The role of a stress protein in the development of a drug-induced allergic response. *Eur. J. Pharmacol.* **183**, 1138-1139.
- Umbenhauer, D.R., Martin, M.V., Lloyd, R.S. and Guengerich, F.P. (1987) Cloning and sequence determination of a complementary DNA related to human liver microsomal cytochrome P-450 S-mephenytoin 4-hydroxylase. *Biochemistry* **26**, 1094-1099.
- Valadon, P. (1992) Cytochrome P450 et activation métabolique du noyau thiophène: exemple de l'acide tienilique et de ses dérivés. Paris V.
- Valadon, Ph., Dansette, P.M., Girault, J.-P., Amar, C. and Mansuy, D. (1996) Thiophene sulfoxides as reactive metabolites: formation upon microsomal oxidation of a 3-aryylthiophene and fate in the presence of nucleophiles in vitro and in vivo. *Chem. Res. Toxicol.* (sous presse).
- van Pelt, F.N.A.M. and Kenna, J.G. (1994) Formation of trifluoroacetylated protein antigens in cultured rat hepatocytes exposed to halothane *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 461-471.
- Vély, F. and Vivier, E. (1996) Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité des cellules NK. *Médecine/sciences* **4**, 458-464.
- Vergani, D., Tsantoulas, D., Eddelston, A.L.W.F. and al., e. (1978) Sensitisation to halothane-altered liver components in severe hepatic necrosis after halothane anaesthesia. *Lancet* **2**, 801-803.

- Vergani, D., Mieli-Vergani, G., Alberti, A., Neuberger, J., Eddleston, A.L.W.F., Davis, M. and Williams, R. (1980) Antibodies to the surface of halothane-altered rabbit hepatocytes in patients with severe halothane-associated hepatitis. *N. Engl. J. Med.* **303**, 66-71.
- Vergeres, G., Winterhalter, K.H. and Richter, C. (1989) Microsomal cytochrome P450: substrate binding, membrane interactions and topology. *Mutat. Res.* **213**, 83-90.
- Veronese, M.E., MacKenzie, P.I., Doecke, C.J., McManus, M.E., Miners, J.D. and Birkett, D.J. (1991) Tolbutamide and phenytoin hydroxylations by cDNA-expressed human liver cytochrome P4502C9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 1112-1118.
- Vinay, P., Paquin, J., Lemieux, G., Gougoux, A. and Bertrand, M. (1980) Metabolism of tienilic acid (ticrynafen) in man. Pharmacokinetic and mass spectrometric studies. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* **5**, 113-125.
- Vittorio, C.C. and Muglia, J.J. (1995) Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. *Archives Internal Medicine* **155**, 2285-2290.
- von Boehmer, H. (1994) Positive selection of lymphocytes. *Cell* **76**, 219-228.
- Wallin, H., Schelin, C., Tunek, A. and Jergil, B. (1981) A rapid and sensitive method for determination of covalent binding of benzo[a]pyrene to proteins. *Chem. Biol. Interactions* **38**, 109-118.
- Walton, B., Simpson, B.R., Strunin, L., Doniach, D., Perrin, J. and Appleyard, A.J. (1976) Unexplained hepatitis following halothane. *Br. Med. J.* **1**, 1171-1176.
- Watkins, P.B., Wrighton, S.A., Maurel, P., Schuetz, E.J., Mendez Picon, G. and Guzelian, P.S. (1985) Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 6310-6314.
- Waxman, D.J. and Azaroff, L. (1992) Phenobarbital induction of cytochrome P450 gene expression. *Biochem. J.* **281**, 577-592.
- Webb, S., Morris, C. and Sprent, J. (1990) Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* **63**, 1249-1256.
- Weltzien, H.U., Moulon, C., Martin, S., Padovan, E., Hartmann, U. and Kohler, J. (1996) T cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. *Toxicology* **107**, 141-151.
- Whitlock, J.P. (1993) Mechanistic aspects of dioxin action. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 754-763.
- Whitlock, J.P., Okino, S.T., Dong, L.Q., Ko, H.S.P., Clarkekatzenberg, R., Qiang, M. and Li, H. (1996) Cytochromes P450 .5. Induction of cytochrome P4501A1: A model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J.* **10**, 809-818.
- Willson, R.A. (1991) The liver: its role in drug biotransformation and as a target of immunologic injury. *Immunol. Allergy Clinics N. Am.* **11**, 555-573.
- Wood, A.J., Bolli, P., Waal-Manning, H.J. and Simpson, F.O. (1978) Ticrynafen: kinetics, protein binding, and effects on serum and urinary uric acid. *Cin. Pharmacol. Ther.* **23**, 697-702.
- Wright, M.C. and Paine, A.J. (1994) Induction of the cytochrome P450 3A subfamily in rat liver correlates with the binding of inducers to a microsomal protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 973-979.

Références

- Yamano, S., Tatsuno, J. and Gonzalez, F.J. (1990) The CYP2A3 gene product catalyses coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochem.* **29**, 1322-1329.
- Yamazaki, H., Inui, Y., Yun, C.H., Mimura, M., Guengerich, F.P. and Shimada, T. (1992) Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of *N*-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* **13**, 1789-1794.
- Zakrzewska, J.M. and Ivanyi, L. (1988) In vitro lymphocyte proliferation by carbamazepine, carbamazepine-10, 11-epoxide, and oxcarbazepine in the diagnosis of drug-induced hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **82**, 110-115.
- Zhang, Z., Fasco, M.J., Huang, Z., Guengerich, F.P. and Kaminsky, L.S. (1995) Human cytochromes P4501A1 and P4501A2: R-warfarin metabolism as a probe. *Drug Metab. Dispos.* **23**, 1339-1345.
- Zia-Amirhosseini, P., Harris, R.Z., Brodsky, F.M. and Benet, L.Z. (1995) Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Nature Med.* **1**, 2-4.
- Zimmerman, H.J. (1978) *Hepatotoxicity. The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver*, (Zimmermann, H.J. Ed.), Appleton Century Crofts, New York.
- Zimmerman, H.J., Lewis, J.H., Ishak, K.G. and Maddrey, W.C. (1984) Ticrynafen-associated hepatic injury: analysis of 340 cases. *Hepatology* **4**, 315-323.

Liste des publications :

- Lecoeur, S., Bonierbale, E., Challine, D., Gautier, J.-C., Valadon, P., Dansette, P.M., Catinot, R., Ballet, F., Mansuy, D. and Beaune, P. (1994) Specificity of in vitro covalent binding of tienilic acid metabolites to human liver microsomes in relationship to the type of hepatotoxicity: comparison with two directly hepatotoxic drugs. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 434-442.
- Robin, M.-A., Maratrat, M., Le Roy, M., Le Breton, F.-P., Bonierbale, E., Dansette, P., Ballet, F., Mansuy, D. and Pessayre, D. (1996) Antigenic targets in tienilic acid hepatitis. Both cytochrome P450 2C11 and 2C11-tienilic acid adducts are transported to the plasma membrane of rat hepatocytes and recognized by human sera. *J. Clin. Invest.* **98**, 1471-1480.
- Bonierbale, E., Debordes, L. and Coppet, L. Application of capillary gas chromatography to study hydrolysis of the nerve agent VX. *Journal of Chromatography. Biomedical Applications.* (sous presse).

Publications dans des chapîtres de livres :

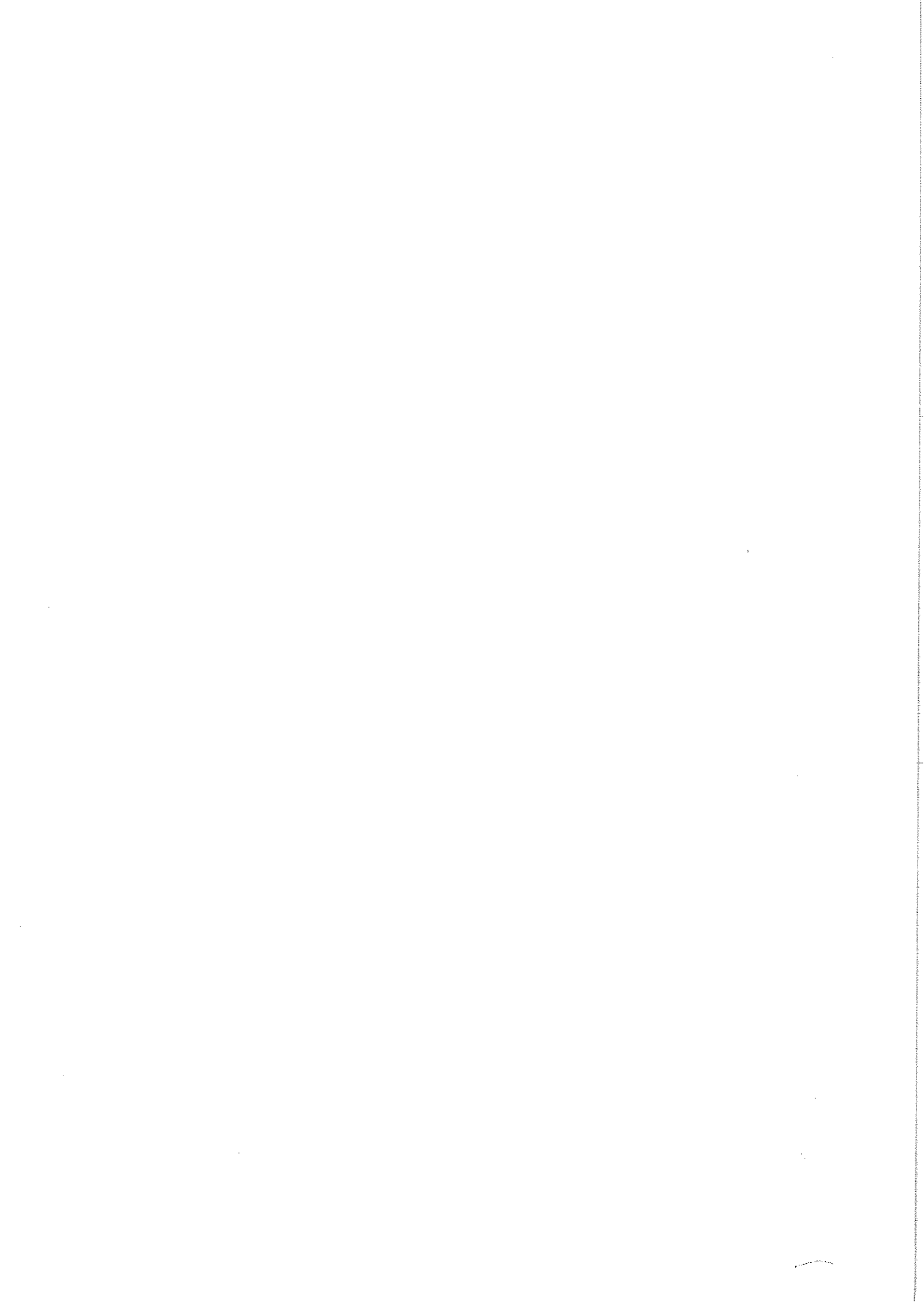
P.M. Dansette, M.P. Lopez-Garcia, C. Amar, C. Pons, P. Valadon, E. Bonierbale, P.H. Beaune and D. Mansuy. "Metabolic activation of the thiophene ring as a primary event in immunoallergic hepatitis to Tienilic acid". *Cytochrome P450, Biochemistry and Biophysics*, p. 193-196. M. Lechner edit., John Libbey's (1994) Lisbonne.

Communication orale en congrès :

- Communication orale au Congrès International BioTech au CHR Purpan, Toulouse.(1994).
E. Bonierbale. Sujet: "Recognition of alkylated P-450 2C9 by Tienilic acid"

Communications écrites en congrès :

- P.M. Dansette, P. Valadon, E. Bonierbale, C. Pons, B. Desfosses, C. Amar, M.P. Lopez-Garcia & D. Mansuy. : A polyclonal antibody that recognizes the covalent binding of tienilic acid to microsomal proteins *FASEB J.* **8**, A1247, X43 (1994), Washington.
- P.M. Dansette, P. Valadon, E. Bonierbale, C. Pons, B. Desfosses, C. Amar, M.P. Lopez-Garcia & D. Mansuy. : A polyclonal antibody that recognizes the covalent binding of tienilic acid to microsomal proteins Drug Metabolism Workshop (1994), Paris.
- Frisoni A, Widmer S, Thirion B, Haberer JP, Moneret-Vautrin DA, Dansette P, Bonierbale E. "Un cas d'hépatite immuno-allergique après anesthésie avec isoflurane". Congrès SFAR (1994), Paris.
- Bonierbale, E., Debordes, L., Coppet, L. "Presence of an organophosphorus hydrolase (OPH) degrading the nerve agent VX in rat plasma demonstrated by direct detection of VX and its P-S bond hydrolysis product". Scientific Conference on Chemical Biological Defense Research (1996), Aberdeen Proving Ground, Maryland, USA.



RÉSUMÉ

Le nombre croissant d'admissions hospitalières provoquées par les effets secondaires d'un traitement thérapeutique constitue un problème majeur de santé publique. L'hépatite médicamenteuse, la pathologie iatrogène la plus fréquente, pose également un problème d'ordre économique. En effet, l'hépatotoxicité des médicaments constitue la première cause de leur retrait du marché pharmaceutique. La non détection de ce potentiel hépatotoxique avant commercialisation provient essentiellement du caractère idiosyncratique de ce type d'hépatites médicamenteuses. Celles-ci se divisent en deux types : les hépatites médicamenteuses qualifiées de directes et à l'inverse les hépatites médicamenteuses immunoallergiques. Les mécanismes sous-jacents des hépatites médicamenteuses idiosyncratiques sont généralement méconnus et leur compréhension constitue donc à la fois un impératif de santé publique et économique. Mon travail s'est inscrit dans cette optique et a consisté à appréhender les premières étapes impliquées dans l'apparition des hépatites idiosyncratiques et en particulier celle induite par l'acide tiénilique (AT). En effet, ce diurétique retiré du marché pharmaceutique français en 1992 a été responsable de nombreuses hépatites immunoallergiques. Les patients atteints de ces hépatites induites par l'AT possèdent des anticorps très spécifiques, désignés anti-LKM₂, dirigés contre le CYP2C9, le P450 responsable de la métabolisation de l'AT.

Les principaux résultats obtenus sont les suivants : nous avons montré que l'activation de l'isomère de l'acide tiénilique par des microsomes hépatiques humains conduit à la formation de sulfoxydes de thiophène. Ces métabolites électrophiles instables, comme ceux de l'AT, réagissent avec les protéines hépatiques avec lesquelles ils forment des adduits covalents. La formation de sulfoxydes de thiophène liée à l'activation de l'AT chez l'homme constitue probablement la première étape impliquée dans les hépatites induites par ce médicament. Nous avons ensuite démontré que la fixation covalente de l'AT après activation par des microsomes hépatiques est très spécifique chez l'homme. En effet, le CYP2C9 est la cible principale des métabolites réactifs de l'AT. L'alkylation du CYP2C9 par l'AT *in vivo* chez l'homme pourrait constituer la seconde étape impliquée dans l'hépatite induite par ce médicament. Nous avons ensuite montré que le CYP2C11, l'homologue du CYP2C9 humain, est une cible privilégiée des métabolites de l'AT chez le rat. Nous montrons que cette fixation covalente sur le CYP2C11 est observable à la fois *in vitro* et *in vivo*. Nous montrons que les adduits de l'AT chez le rat sont principalement localisés au niveau des hépatocytes centrolobulaires. L'alkylation majoritaire des hépatocytes centrolobulaires chez l'homme pourrait favoriser la présentation d'adduits de l'AT aux cellules immunocompétentes sanguines et constituer la troisième étape des hépatites induites par le médicament. Nous montrons qu'en effet, les patients traités avec l'AT possèdent des anticorps capables de reconnaître l'AT lorsque celui-ci est lié à des protéines.

MOTS CLÉS : acide tiénilique, hépatite immunoallergique, anti-LKM₂, CYP2C9, CYP2C11, sulfoxydes de thiophène, métabolite réactif, fixation covalente, anticorps.