



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ph N 2000/71
Double

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2000

FACULTE DE PHARMACIE

**POLYMORPHISME GENETIQUE DU CYTOCHROME P450 2E1
ET
SUSCEPTIBILITÉ A L'ALCOOL**

THESE



Présentée et soutenue publiquement

Le 12 Décembre 2000

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par

Rachida ELOUARDI

Née le 29 mai 1973 à MONT SAINT MARTIN (54)

Membres du Jury

Président : Mademoiselle Marie-Madeleine GALTEAU, Professeur

Juges : Madame Sylvie FOURNEL-GIGLEUX, Directeur de recherche INSERM
Madame Ghislaine HUBSCH, Pharmacien d'officine

BU PHARMA-ODONTOL



D

104 057022 0

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

2000



DB 84210

FACULTE DE PHARMACIE

**POLYMORPHISME GENETIQUE DU CYTOCHROME P450 2E1
ET
SUSCEPTIBILITE A L'ALCOOL**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 12 Décembre 2000

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par

Rachida ELOUARDI

Née le 29 mai 1973 à MONT SAINT MARTIN (54)

Membres du Jury

Président : Mademoiselle Marie-Madeleine GALTEAU, Professeur

Juges : Madame Sylvie FOURNEL-GIGLEUX, Directeur de recherche INSERM
Madame Ghislaine HUBSCH, Pharmacien d'officine

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : Mme Chantal FINANCE

Vice Doyen : Mme Anne ROVEL

DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mme BESSON Suzanne
Mme GIRARD Thérèse
M. LECTARD Pierre

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mme	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mme	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Physico-chimie appliquée à la formulation pharmaceutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mle	FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme	HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M.	JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratiques officinales
-----	------------------	-----------------------

PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

A NOTRE PRESIDENT DE THESE,

Mademoiselle Marie-Madeleine GALTEAU,

Professeur de biochimie,

Vous nous avez guidés tout au long de ce travail.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre reconnaissance et notre profond respect.

A NOS JUGES

Madame Sylvie FOURNEL-GIGLEUX,

Directeur de recherche INSERM

Qui nous a fait l'honneur de siéger dans notre jury.

Nous vous en remercions vivement.

Madame Ghislaine HUBSCH,

Pharmacien d'officine,

Nous sommes honorés de vous compter parmi nos juges.

Nous sommes très sensibles à la compréhension que vous nous avez témoignée et aux conseils que vous nous avez prodigués au cours de notre stage.

A mes parents,

A mes frères et soeurs : Touria, Mohamed, Halima, Ali.

A Emmanuel,

A mon neveu Axel et ma nièce Sara,

A toute ma famille,

A tous mes amis,

Et à toutes les personnes qui m'ont aidée et encouragée.

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

D'e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDERES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION	1
1 - ACTIVITE ENZYMATIQUE	2
1.1 - Présentation du CYP2E1	2
1.2 - Distribution tissulaire	4
1.2.1 - Chez le rat	4
1.2.2 - Chez l'homme	5
1.2.2.1 - Distribution hépatique	
1.2.2.2 - Distribution extra-hépatique	
1.3 - Les substrats	6
1.4 - Les inducteurs	8
1.4.1 - Définition du phénomène d'induction	8
1.4.2 - Mécanisme de l'induction enzymatique	8
1.4.3 - Les substances inductrices	9
1.4.3.1 - Caractéristiques communes des substances inductrices	
1.4.3.2 - Classification des inducteurs	
1.4.4 - L'induction du CYP2E1	10
1.5 - Les inhibiteurs	12
1.5.1 - Le disulfirame	12
1.5.2 - Le chlométhiazole	14

1.5.3 - L'isoniazide	14
1.5.4 - Autres inhibiteurs	17
2 - MESURE DE L'ACTIVITE DU CYP2E1 : UTILISATION DE LA CHLORZOXAZONE	18
2.1 - Test à la chlorzoxazone	18
2.2 - Variations biologiques du test	26
2.2.1 - Sujets	26
2.2.2 - Résultats	27
2.2.2.1 - Effet du tabac	
2.2.2.2 - Effet du sexe	
2.2.2.3 - Effet de l'état physiologique	
2.2.2.4 - Effet des solvants organiques	
2.2.2.5 - Effet du jus de pamplemousse	
2.3 - Régulation de l'activité du CYP2E1	35
2.3.1 - Physiologique	35
2.3.1.1 - L'âge	
2.3.1.2 - L'alimentation	
2.3.2 - Pathologique	40
2.3.2.1 - Le diabète	
2.3.2.2 - L'obésité	
3 - POLYMORPHISME GENETIQUE	43
3.1 - Définition du polymorphisme	43
3.2 - Localisation du <i>CYP2E1</i> sur le génome	43
3.3 - Méthode de génotypage	44
3.4 - Différents polymorphismes connus	44
3.4.1 - Présentation des polymorphismes	

3.4.2 - Influence du polymorphisme du site <i>RsaI</i> sur l'activité du CYP2E1 et sur l'inductibilité par l'alcool	
3.5 - Fréquences alléliques observées au sein de différentes populations	54
3.5.1 - Population saine	
3.5.2 - Population alcoolique	
3.6 - Susceptibilité à l'alcool	57
3.6.1 - Implication du polymorphisme <i>RsaI</i> dans le syndrome alcoolique	
3.6.2 - Etudes associant polymorphisme du CYP2E1 et susceptibilité à l'alcool	
CONCLUSION	60

LISTE DES ABREVIATIONS

CYP2E1 : Cytochrome P450 2E1.

CYP2E1 : Gène du cytochrome P450 2E1.

MEOS : Microsomal ethanol-oxidizing system.

ADH : Alcool déshydrogénase.

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide.

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase.

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate déshydrogénase.

REL : Reticulum endoplasmique lisse.

CYP2C9 : Cytochrome P450 2C9.

CYP1A2 : Cytochrome P450 1A2.

CZX : Chlorzoxazone.

HCZX : 6-hydroxychlorzoxazone.

DNID : Diabète non insulino-dépendant.

CYP3A4 : Cytochrome P450 3A4.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Oxydation de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase (ADH) et le NAD, le MEOS et le NADPH, une combinaison de NADPH oxydase et catalase, et la xanthine oxydase et la catalase.

Figure 2 : Concentration plasmatique de la chlorzoxazone en fonction du temps.

Figure 3 : (A) Concentrations en fonction du temps de la chlorzoxazone et de la 6-hydroxychlorzoxazone après administration orale de 250 mg de chlorzoxazone chez 16 volontaires sains.
(B) Excrétion urinaire cumulative de la 6-hydroxychlorzoxazone en pourcentage de la dose.

Figure 4 : Courbes concentrations-temps de la chlorzoxazone et de la 6-hydroxychlorzoxazone après des doses de 250 mg et de 750 mg.

Figure 5 : Excrétion urinaire cumulative de la 6-hydroxychlorzoxazone en pourcentage de la dose après administration orale de 250 mg et 750 mg de chlorzoxazone.

Figure 6 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone chez des hommes *versus* des femmes .

Figure 7 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone chez des fumeurs non alcooliques *versus* des non fumeurs et chez des fumeurs alcooliques *versus* des non fumeurs.

Figure 8 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone chez des sujets obèses avec ou sans DNID.

Figure 9 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone chez des travailleurs exposés à des solvants organiques volatils dans une fabrique de chaussures au Mexique.

Figure 10 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone chez neuf sujets contrôles ayant reçu 500 mg de chlorzoxazone seule et avec 200 ml de jus de pamplemousse.

Figure 11 : Effet du régime glucidique chez des patients compliant et non compliant après administration orale de 250 mg de chlorzoxazone.

Figure 12 : Représentation schématique du gène du *CYP2E1*.

Figure 13 : Carte de restriction de la région en amont du gène du *CYP2E1* en utilisant l'enzyme de restriction *XbaI*.

Figure 14 : Carte de restriction de la région en amont du gène du *CYP2E1* en utilisant l'enzyme de restriction *DraI*.

Figure 15 : Relation entre la présence de l'insertion de la mutation et l'activité métabolique du CYP2E1, décrite selon le rapport métabolique de la chlorzoxazone à 3 heures en présence d'alcool (case hachurées) et d'obésité (cases hachurées) .

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Substrats métabolisés par le CYP2E1.

Tableau II : Effet d'une dose unique de disulfirame (500 mg) sur les paramètres pharmacocinétiques de la chlorzoxazone.

Tableau III : Effet de l'administration d'isoniazide sur la clairance plasmatique totale de la chlorzoxazone.

Tableau IV : Mesure des paramètres pharmacocinétiques de la chlozoxazone et de la 6-hydroxychlorzoxazone après administration orale de de 250 mg .

Tableau V : Caractéristiques biochimiques et physiques des patients au début de l'étude.

Tableau VI : BMI, ALT, et pharmacocinétique de la chlorzoxazone chez les patients au début de l'étude et deux mois après prescription d'un régime glucidique.

Tableau VII : Influence de l'obésité sur le métabolisme de certains substrats du CYP2E1.

Tableau VIII : Fréquences des mutations, au niveau du gène du *CYP2E1*, observées dans les trois groupes de sujets.

Tableau IX : Distribution des variants alléliques au sein de trois populations différentes étudiées.

Tableau X : Nouveaux polymorphismes au niveau du gène du *CYP2E1*.

Tableau XI : Fréquences alléliques du site *RsaI* au sein de différentes populations.

Tableau XII : Fréquences alléliques du site *RsaI* chez des alcooliques de nationalité différente.

INTRODUCTION

Seule une minorité d'alcooliques développe une cirrhose hépatique suite à un abus chronique durant plusieurs années ou décennies.

Les lésions précirrhotiques et fibreuses hépatiques sont courantes chez les alcooliques, mais plus d'un tiers des alcooliques survivent aux effets toxiques chroniques de l'alcool sans développer aucun signe histopathologique de syndrome hépatique alcoolique.

Des agents environnementaux, nutritionnels et infectieux agissant, séparément ou de manière combinée, peuvent expliquer l'absence d'un effet dose-réponse de l'alcool sur le foie.

Des études chez des jumeaux ont néanmoins montré que la susceptibilité à la maladie alcoolique hépatique était au moins partiellement déterminée génétiquement.

Jusqu'à présent, les recherches sur la génétique du syndrome hépatique lié à l'alcool se sont concentrées sur les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'éthanol.

Parmi ces enzymes, le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) est le plus intéressant, dans la mesure où une importante consommation chronique d'alcool multiplie fortement son expression, résultant en une augmentation de la formation de métabolites toxiques.

Plusieurs polymorphismes ont été observés sur le gène du *CYP2E1* et de nombreuses études ont été réalisées afin d'établir une éventuelle association entre le polymorphisme génétique du CYP2E1 et la susceptibilité à l'alcool.

Ainsi l'objet de ce travail sera-t-il d'expliquer le rôle du CYP2E1 dans la susceptibilité génétique à l'alcool.

Dans une première partie, nous présenterons le CYP2E1 en précisant sa distribution tissulaire, ses substrats, ses inducteurs et ses inhibiteurs.

La seconde partie de ce travail nous permettra d'étudier l'activité du CYP2E1 : nous aborderons la mesure et la régulation de cette activité.

La troisième et dernière partie de ce travail sera consacrée au polymorphisme génétique du CYP2E1 et à son implication dans la susceptibilité à l'alcool.

1. ACTIVITE ENZYMATIQUE

1.1 - PRESENTATION DU CYP2E1

Les cytochromes P450 constituent une super-famille d'enzymes jouant un rôle majeur dans la détoxicification de xénobiotiques et dans le métabolisme de lipides endogènes (1,2,3). Douze familles de gènes et vingt deux sous-familles ont été décrites chez l'homme (1).

Les protéines sont classées en familles et sous-familles, selon leurs similarités dans les séquences d'acides aminés (4), mais chacun des membres de ces familles présente une spécificité de substrat, une activité catalytique et des caractéristiques immunologiques distinctes.

Parmi les différents cytochromes P450 humains, le CYP2E1 suscite beaucoup d'intérêt (5,6,7,8) en raison de son implication dans l'activation métabolique de plusieurs composés chimiques toxiques et carcinogènes.

Le CYP2E1 est le principal composant du système d'oxydation microsomale de l'éthanol : microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS) (7).

Présentation du microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS) :

L'éthanol n'est pas uniquement produit par les levures de bière mais il est également présent chez les mammifères en faible quantité (7). La fermentation bactérienne au niveau intestinal constitue une des voies de production de l'éthanol.

Cependant, l'éthanol est principalement un composé exogène facilement absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal. Seuls 2 à 10 % de l'éthanol absorbé sont éliminés au niveau rénal et pulmonaire (7), le reste est principalement oxydé au niveau hépatique. Une hépatotectomie ou des lésions hépatiques provoquent une importante diminution du taux d'élimination de l'éthanol dans le sang.

Jusqu'à ces trente dernières années, un seul mécanisme significatif du métabolisme de l'éthanol était supposé exister (7). Ce mécanisme impliquait de multiples formes d'alcool déshydrogénase (ADH), qui est une enzyme cytosolique catalysant la conversion de l'éthanol en acétaldehyde, couplée à la réduction du NAD en NADH (figure 1).

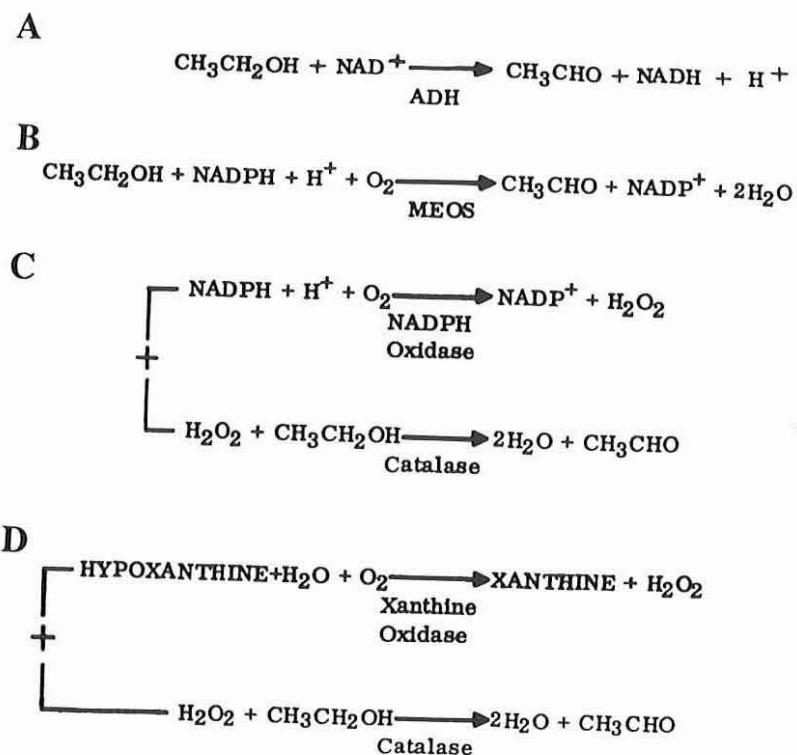


Figure 1 : Oxydation de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase (ADH) et le NAD (A), le MEOS et le NADPH (B), une combinaison de NADPH oxydase et catalase (C), et la xanthine oxydase et catalase (D) (d'après 7).

Le rôle de la catalase, localisée dans les péroxyosomes, dans l'oxydation de l'éthanol *in vitro* en présence d'un système générant du péroxyde d'hydrogène (H_2O_2) était connu (figure 1) mais cette catalase ne semble pas jouer un rôle majeur dans les conditions physiologiques.

Cependant, certaines caractéristiques du métabolisme de l'éthanol, telles que l'augmentation adaptative après ingestion chronique, ne peuvent pas être compatibles avec l'ADH ou la catalase. Par conséquent l'hypothèse de l'existence d'un autre mécanisme a été émise (7).

La première indication sur la possibilité d'une interaction de l'éthanol avec le réticulum endoplasmique repose sur des observations morphologiques chez l'homme et les rats : l'ingestion d'éthanol a pour conséquence une prolifération du réticulum endoplasmique lisse (REL). Cette prolifération du REL était similaire à celle observée après administration d'une grande variété d'hépatotoxines, de barbituriques, et autres agents thérapeutiques et additifs alimentaires. Comme la plupart des substances provoquant une prolifération du REL sont partiellement métabolisées par le système enzymatique du cytochrome P450 localisé

dans le REL, il a été supposé que l'éthanol était métabolisé par un processus similaire (7). Ce système est présent au niveau des microsomes hépatiques *in vitro* et il est inducible par une ingestion chronique d'éthanol *in vivo*. Ce nouveau mécanisme de métabolisme de l'éthanol fait intervenir un cytochrome P450 : **le CYP2E1**.

Le CYP2E1 est impliqué dans l'oxydation de l'éthanol ainsi que dans la production de radicaux libres, pouvant initier une peroxydation lipidique (9,7,10,11). Il joue également un rôle clé dans la toxicité de certains xénobiotiques tels que les *N*-nitrosamines, présentes dans la fumée de cigarette et l'alimentation et suspectées de jouer un rôle non négligeable dans l'apparition de certains types de cancer. Le chlorure de vinyle, les hydrocarbures halogénés, le benzène et certains de ses dérivés sont d'autres xénobiotiques métabolisés par le CYP2E1 .

Le système enzymatique P450 est le plus important et le plus largement étudié. Bien que le CYP2E1 soit localisé dans plusieurs organes (12), les concentrations les plus élevées se rencontrent dans le foie et en particulier dans la zone périveineuse (13).

1.2 - DISTRIBUTION TISSULAIRE

1.2.1 - Chez le rat

Le CYP2E1 est présent dans les hépatocytes de la région périveineuse du lobule hépatique, au niveau du reticulum endoplasmique ainsi qu'au niveau de la membrane plasmatique.

Les cellules de Kupffer présentent aussi du CYP2E1 mais en plus faible quantité que les hépatocytes (7).

On observe aussi du CYP2E1 au niveau des tissus du tractus alimentaire, comme la langue, l'oesophage, l'épithélium squameux de l'estomac, et la surface épithéliale du côlon proximal.

Le CYP2E1 est également localisé dans les poumons, les reins, et les microsomes de la muqueuse nasale (7).

1.2.2 - Chez l'homme

1.2.2.1 - Distribution hépatique

Au niveau hépatique, le CYP2E1 est essentiellement localisé dans la région périveineuse du lobule hépatique (7).

Chez le nourrisson, il existe toujours une expression du CYP2E1, ainsi que chez le foetus, à partir de seize semaines de grossesse. Cependant, dans ce dernier cas, la détection de l'enzyme semble être fonction de l'âge gestationnel : le CYP2E1 n'est pas présent à la dixième semaine de gestation.

Le poids moléculaire du CYP2E1 foetal est légèrement inférieur à celui du CYP2E1 adulte mais d'un point de vue fonctionnel, il est similaire à la forme adulte de CYP2E1 : il est capable d'oxyder l'éthanol et il est inducible par de nombreux xénobiotiques tels que l'éthanol et le clofibrate (LIPAVLON®); ce qui implique que l'induction *in utero* du CYP2E1 pourrait survenir chez des mères alcooliques ou traitées pour hypercholestérolémie (14). L'induction du CYP2E1 foetal pourrait augmenter la formation de métabolites toxiques dérivés non seulement de l'éthanol mais aussi d'autres substrats du CYP2E1 (comme le paracétamol ou la *N*-nitrosodiméthylamine) et pourrait alors augmenter la susceptibilité foetale aux effets tératogènes de ces agents (14).

En outre, comme le CYP2E1 intervient dans le métabolisme de l'acide arachidonique et probablement dans celui des prostaglandines, l'induction du CYP2E1 foetal risquerait de perturber l'équilibre des prostaglandines impliquées dans la croissance et le développement foetal (14).

En considérant les diverses conséquences possibles de l'induction du CYP2E1 chez le foetus, ces informations pourraient avoir un impact profond sur la compréhension de la tératogénicité associée à la consommation d'alcool durant la grossesse (14).

1.2.2.2 - Distribution extra-hépatique

Le CYP2E1 est également présent dans le mucus oesophagien, qui est un tissu capable d'activer des produits chimiques carcinogènes en métabolites réactifs pouvant se lier à l'ADN (15).

L'épithélium de l'endomètre humain a la capacité de produire du CYP2E1, connu pour générer des métabolites pouvant affecter les récepteurs aux estrogènes (16).

Au niveau des macrophages, il existe aussi une expression du CYP2E1 (17). Différentes méthodes ont permis de détecter le CYP2E1 dans les lymphocytes et selon leur sensibilité, on pourrait mesurer l'induction du CYP2E1 après exposition à différents xénobiotiques métabolisés par ce cytochrome (18).

Enfin le CYP2E1 est exprimé dans le cerveau et il est détectable dès la septième semaine de gestation (19).

1.3 - LES SUBSTRATS

Le CYP2E1 catalyse l'oxydation de plus de soixante-quinze substrats xénobiotiques et leurs caractéristiques structurales permettent de déterminer si la catalyse par le CYP2E1 conduira à une détoxicification ou à une toxicification (20). Les métabolites produits au niveau des microsomes peuvent dans certains cas être plus toxiques que les précurseurs (7).

Ces substrats, qui peuvent être des substances médicamenteuses ou non, appartiennent à différentes classes chimiques (tableau I).

Substances médicamenteuses et leurs utilisations thérapeutiques	
Paracétamol	Antalgique et antipyrrétique
Caféine	Psychostimulant
Chlorzoxazone	Myorelaxant d'action centrale
Théophylline	Antiasthmatique
Isoniazide	Antituberculeux
Tamoxifène	Antiœstrogène utilisé dans le cancer du sein hormonodépendant
Enflurane, sévoflurane, halothane, méthoxyflurane, isoflurane	Anesthésiques halogénés

Substances non médicamenteuses			
<u>1) Alcools, aldéhydes, cétones et nitriles :</u>			
Acétaldéhyde		Isopropanol	
Butanol		Méthanol	
Ethanol		Propanol	
Glycérol*		Pentanol	
<u>2) Nitrosamines, composés azotés :</u>			
Azoxyméthane			
<i>N,N</i> -Diéthylnitrosamine			
<i>N,N</i> -Diméthylnitrosamine			
<u>3) Substrats réductibles :</u>			
Tétrachlorure de carbone			
Chrome			
Oxygène			
<u>4) Composés aromatiques :</u>			
Bromobenzène		<i>p</i> -Nitrophénol	
Benzène		3-Hydroxypyridine	
Phénol		Pyrazole	
Pyridine		Styrène	
		Toluène	
<u>5) Ethers :</u>			
Diéthyle éther			
Méthyle <i>t</i> -butyle éther			
<u>6) Acides gras* :</u>			
Acide arachidonique			
Acide laurique			
<u>7) Alcanes et alcènes halogénés et non halogénés :</u>			
Acétone*	Dibromoéthane	Pentane	
Acétol	Dichlorométhane	1,1,1,2-Tétrafluoroéthane	
Acétoacétate*	1,2-Dichloropropane	1,1,1-Trichloroéthane	
1,3-Butadiène	1,2-Epoxy-3-butène	Trichloroéthylène	
Chloroforme	Ethane	Chlorure de vinyle	
Chlorométhane	Hexane	Bromure de vinyle	

* Composés endogènes

Tableau I : Substrats métabolisés par le CYP2E1 (d'après 7)

1.4 - LES INDUCTEURS

1.4.1 - Définition du phénomène d'induction

Le phénomène d'induction enzymatique est connu depuis longtemps pour ses conséquences sur la réponse des enzymes de biotransformation d'autres médicaments. Une substance inductrice est capable d'entraîner une activation des enzymes de biotransformation d'autres médicaments.

De plus, certains inducteurs activent leur propre métabolisme (21).

Pour que l'induction se manifeste, il faut :

- que l'agent inducteur soit utilisé de manière chronique ;
- que le médicament induit soit fortement métabolisé.

Un médicament dont le pourcentage de métabolisation est faible, sera donc peu sensible à cet effet. Les principales conséquences de cette induction seront :

- * une diminution des taux plasmatiques du médicament induit;
- * une diminution de sa demi-vie avec augmentation de la clairance totale (21).

L'inducteur peut réduire l'efficacité des substances administrées de façon concomitante.

1.4.2 - Mécanisme de l'induction enzymatique

L'activité d'une enzyme peut augmenter sous l'influence de différents phénomènes (22) :

- par l'action de facteurs agissant sur le taux de protéines
 - augmentation de la synthèse des protéines et donc de l'enzyme;
 - ralentissement de la dégradation et de l'élimination de ces protéines;
- par l'action de facteurs agissant sur le niveau d'activité enzymatique.

Du point de vue expérimental, il a été prouvé que l'induction enzymatique est indissociable d'une synthèse protéique **de novo**. En effet, l'induction est inhibée par l'actinomycine D et la piromycine qui sont des inhibiteurs de la synthèse protéique.

1.4.3 - Les substances inductrices

Les inducteurs des enzymes du métabolisme des médicaments sont très variés, au niveau de :

- leurs structures chimiques;
- leurs effets inducteurs;
- les enzymes qu'ils induisent;
- leur mécanisme d'action;
- les animaux et les organes qui y sont sensibles;
- les phénomènes annexes engendrés.

1.4.3.1 - Caractéristiques communes des substances inductrices

Si les substances inductrices sont très hétérogènes en structure et en activité, elles possèdent néanmoins des points communs (22) :

- elles sont liposolubles, notamment pour pénétrer à l'intérieur de l'hépatocyte;
- elles se concentrent à des taux suffisants dans la cellule, avec une affinité pour le réticulum endoplasmique;
- elles sont des substrats des enzymes qu'elles induisent, ou au moins sont liées à elles.

1.4.3.2 - Classification des inducteurs (21)

Les inducteurs de type hydrocarbure aromatique polycyclique qui agissent plus particulièrement sur les cytochromes P450 de type 1A.

Les inducteurs de type phénobarbital qui vont augmenter la synthèse des cytochromes de type 2B et 3A.

Les inducteurs de type cyanoprégnénolone concernant plus particulièrement les cytochromes P450 de type 3A.

Les inducteurs de type éthanol, connus pour induire les cytochromes P450 de type 2E.

Les inducteurs de type clofibrate, inducteurs des cytochromes P450 de type 1.

L'inducteur va stimuler la production de certaines isoenzymes du cytochrome P450 après qu'un signal soit transmis jusqu'à l'ADN afin d'en augmenter la transcription.

1.4.4 - L'induction du CYP2E1

Le CYP2E1 est induit par une variété d'états chimiques et physiologiques. En effet, l'un des traits les plus caractéristiques du CYP2E1, qui le distingue des autres mécanismes de métabolisme de l'éthanol, est son inductibilité démontrée chez plusieurs espèces incluant l'homme (7, 23).

L'induction du CYP2E1 est un phénomène complexe pouvant s'expliquer par différents mécanismes : activation de la transcription, augmentation de l'efficacité de la traduction de l'ARNm, stabilisation de l'ARNm ou de la protéine (7).

De nombreux xénobiotiques augmentent le taux de CYP2E1 dans les microsomes hépatiques. La plupart des composés induisant le CYP2E1 sont aussi des substrats pour cette enzyme (20).

Les inducteurs du CYP2E1 sont donc nombreux et sont également des substrats pour l'enzyme. Il s'agit par exemple de l'éthanol, l'acétone, l'isoniazide, du benzène, du phénobarbital, et des hydrocarbures polycycliques présents dans la fumée de cigarette.

En raison de sa large consommation, l'éthanol est l'un des plus importants composés métabolisés par le CYP2E1.

Le CYP2E1 participe faiblement au métabolisme de l'éthanol chez les individus non alcooliques (24), mais à des concentrations alcooliques sanguines élevées et chez des consommateurs chroniques, le CYP2E1 joue un rôle majeur dans le métabolisme de ce substrat car l'alcool **multiplie son activité par dix** (24).

Pendant l'administration d'éthanol, le pourcentage de métabolisme de cette drogue chez des patients alcooliques, est supérieur à celui que l'on observe chez des sujets non alcooliques, ce qui résulte probablement d'une augmentation du contenu hépatique en CYP2E1.

L'oxydation de l'éthanol catalysée par le CYP2E1 a pour conséquence la formation d'acétaldéhyde, d'anions superoxyde, de peroxyde d'hydrogène et de radicaux hydroxyéthyles (24). La peroxydation lipidique résultante intervient dans le syndrome

hépatique lié à l'alcool et la fibrose, et les radicaux hydroxyéthyles pourraient initier des atteintes immunologiques par liaison covalente avec des protéines microsomales (24,11).

La consommation chronique d'alcool contribue à l'induction du CYP2E1 (6), en agissant au niveau post-transcriptionnel (et donc sans élévation du taux d'ARNm) par stabilisation protéique. Cette consommation excessive d'alcool **multiplie par vingt** l'expression du CYP2E1 *in vivo*, augmentant ainsi la formation des métabolites toxiques, des radicaux oxygénés et la peroxydation lipidique au niveau hépatique.

De nombreux substrats du CYP2E1 sont bioactivés en hépatotoxines ou hépatocarcinogènes et l'induction du CYP2E1 provoque une plus forte susceptibilité à la toxicité de ces composés (25,26,23).

Le paracétamol, par exemple, est métabolisé par le CYP2E1 en un métabolite réactif : la *N*–acétyl-*p* benzoquinone imine (NAPQI). Cette activation conduit à une toxicité hépatique chez des sujets non alcooliques, lorsque les doses de paracétamol sont élevées.

Cependant, des doses beaucoup plus faibles sont hépatotoxiques chez des sujets alcooliques. On peut donc penser que l'ingestion chronique d'éthanol potentialise le métabolisme du paracétamol en un métabolite réactif via le CYP2E1 (20).

L'induction du CYP2E1 par un produit chimique peut donc augmenter la toxicité d'un autre composé chimique; c'est le cas, par exemple, du tétrachlorure de carbone, dont l'hépatotoxicité est augmentée chez des rats traités avec de l'acétone ou d'autres alcools aliphatiques (25).

1.5 - LES INHIBITEURS

1.5.1 - Le disulfirame

Le disulfirame : ESPERAL®, utilisé comme adjuvant dans la prévention des rechutes au cours du traitement de l'alcoolodépendance et son métabolite réduit, le diéthylidithiocarbamate, ont été identifiés comme des inhibiteurs sélectifs du CYP2E1 *in vitro* (27,3).

L'effet du disulfirame sur l'activité du CYP2E1 *in vivo* a été étudié en mesurant les paramètres pharmacocinétiques de la chlorzoxazone (drogue myorelaxante, utilisée comme marqueur de l'activité du CYP2E1) (27) chez des sujets sains prétraités avec une dose unique de 500 mg de disulfirame; la dose de chlorzoxazone administrée étant de 750 mg.

Les sujets de l'étude sont des hommes non fumeurs, ne présentant pas de signes de maladie hépatique ou rénale et n'ayant pris aucun médicament pendant la durée de l'étude. De même, ils n'ont pris ni caféine, ni alcool. Chacun des sujets a reçu 750 mg de chlorzoxazone après une nuit de jeûne et 500 mg de disulfirame neuf à dix heures avant l'administration de chlorzoxazone (27).

Le tableau II représente l'effet d'une dose de 500 mg de disulfirame sur les paramètres pharmacocinétiques de la chlorzoxazone.

		Sujets contrôles			Sujets traités avec du disulfirame		
Sujets	Poids (kg)	Cmax (µg/ml)	CL (ml/kg/min)	T½(h)	Cmax (µg/ml)	CL (ml/kg/min)	T½ (h)
1	73	31,5	2,75	0,66	47,2	0,55	3,5
2	73	29,7	2,06	1,40	40,5	0,41	5,8
3	76	7,8	5,92	0,75	30,6	0,53	5,8
4	66	26,9	3,33	0,59	53,7	0,46	5,1
5	89	15,6	3,37	0,91	27,6	0,56	5,4
6	98	12,3	2,24	1,20	32,5	0,41	5,2
Moyenne ± Ecart type	79 ± 12	20.6 ± 9.9	3.28 ± 1.40	0.92 ± 0.32	38.7 ± 10.3**	0.49 ± 0.07*	5.1 ± 0.9**

Cmax : Concentration plasmatique maximum; CL : clairance totale; T½ : demi-vie d'élimination

** p < 0.005 ; * p < 0.001

Tableau II : Effet d'une dose unique de disulfirame (500mg) sur les paramètres pharmacocinétiques de la chlorzoxazone (d'après 27).

Ce tableau montre que, par rapport aux sujets contrôles, les sujets traités avec du disulfirame présentent une concentration plasmatique de la chlorzoxazone (Cmax) et une demi-vie d'élimination de la chlorzoxazone ($T_{1/2}$) plus importantes ainsi qu'une clairance totale (CL) moins élevée. Chez ces sujets, le métabolisme de la chlorzoxazone est diminué ; l'activité du CYP2E1 (qui métabolise la chlorzoxazone) est donc diminuée.

Chez les sujets contrôles, les concentrations plasmatiques de chlorzoxazone sont peu homogènes, ce qui s'explique par la grande variabilité interindividuelle dans l'activité du CYP2E1.

➤ Le disulfirame est donc un inhibiteur efficace de l'activité du CYP2E1, comme le montre l'importante diminution de la clairance de la chlorzoxazone.

L'administration d'une dose unique de disulfirame pourrait donc servir de moyen efficace pour décrire l'implication du CYP2E1 dans la biotransformation des xénobiotiques chez l'homme (27). En outre, l'administration de disulfirame pourrait constituer une alternative thérapeutique efficace dans le traitement des toxicités dues aux pro-toxines activées par le CYP2E1.

Cependant, le mécanisme d'inactivation n'a pas encore été démontré; le disulfirame serait réduit en diéthyldithiocarbamate, produisant une forme soufrée active qui inactiverait le CYP2E1 (28).

En complément de l'étude précédente, des recherches ont été menées afin d'évaluer l'effet d'une administration au long cours de disulfirame sur le métabolisme de certains médicaments chez l'homme (27). Dans ce cas, on observe une inhibition du métabolisme et de la clairance de nombreux composés tels que l'antipyrine, la théophylline, la caféine, le paracétamol ou encore la phénytoïne.

Pour certains de ces composés (antipyrine, paracétamol et théophylline), le disulfirame agirait par inhibition du CYP2E1. Cependant, les altérations du métabolisme de la phénytoïne (substrat du CYP2C9) et de la caféine (substrat du CYP1A2), suggèrent qu'une administration au long cours de disulfirame se traduit par une inhibition généralisée des cytochromes P450.

D'autres études sont nécessaires afin de confirmer l'inhibition spécifique du CYP2E1 par un traitement aigu au disulfirame (27).

1.5.2 - Le chlométhiazole

Des études *in vivo* chez le rat ont montré que le chlométhiazole (drogue sédative et anticonvulsivante) est un inhibiteur du CYP2E1 agissant au niveau post-traductionnel (29).

Chez l'homme, ce produit est un inhibiteur efficace du métabolisme de la chlorzoxazone et donc de l'activité du CYP2E1 (30).

1.5.3 - L'isoniazide

L'isoniazide, médicament antituberculeux, a été identifié comme un agent inducteur chez le rat.

Le premier mécanisme majeur de métabolisme pour l'isoniazide est la *N*-acétylation par la NAT-2 : *N*-acétyl transférase de type 2, dont l'activité est distribuée de manière polymorphe et dont deux phénotypes sont communément présents dans la population : **acétyleurs lents** et **acétyleurs rapides**. Ainsi, par rapport aux acétyleurs rapides, les acétyleurs lents ont une concentration plasmatique d'isoniazide plus élevée après administration orale et un taux réduit d'élimination du médicament (31).

De plus, chez l'homme, l'isoniazide a un effet d'inhibition- induction sur le CYP2E1 : une étude chez des volontaires sains (de phénotype acétyleur lent) reposant sur l'administration concomitante d'isoniazide et de chlorzoxazone, a montré que l'isoniazide provoque une diminution de la clairance de la chlorzoxazone (32).

Les sujets n'ont pris ni alcool ni médicament durant l'étude et la semaine précédant l'étude.

L'isoniazide est administré à raison de 300 mg/jour pendant sept jours (J1 à J7).

La chlorzoxazone est administrée à trois moments :

- quatre jours avant le début de l'administration de l'isoniazide (J-4)
- le dernier jour d'administration de l'isoniazide (J7)
- deux jours après la dernière dose d'isoniazide (J9).

La figure 2 présente les résultats de l'administration concomitante d'isoniazide et de chlorzoxazone chez des sujets sains.

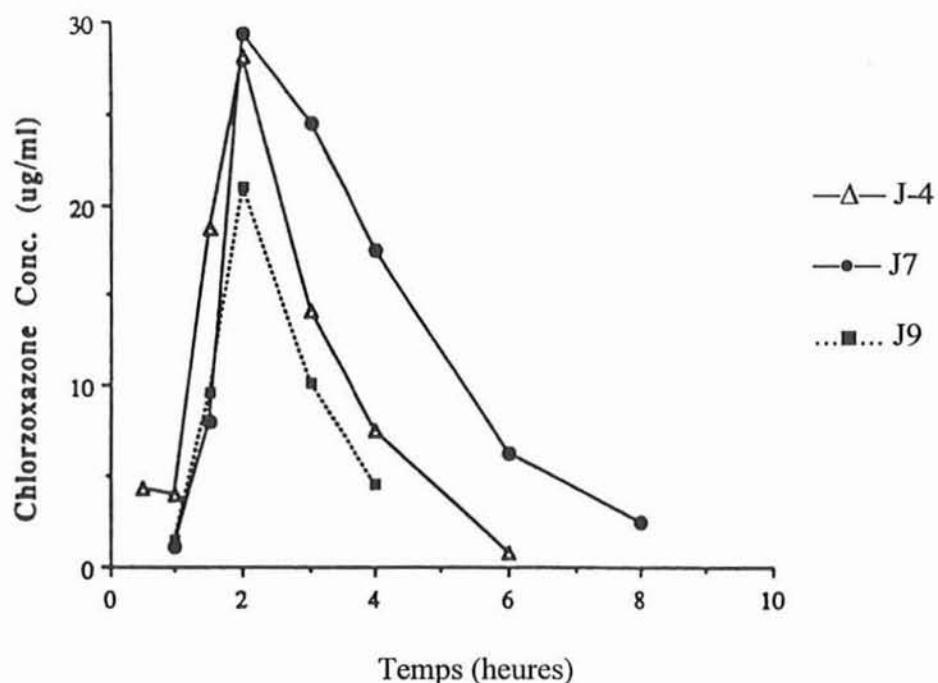


Figure 2 : Concentration plasmatique de la chlorzoxazone en fonction du temps (d'après 32)

Lorsque la chlorzoxazone est administrée seule (J-4), le pic plasmatique est atteint en 2 heures et son élimination est terminée en 6 heures.

Lorsque l'isoniazide est administré de manière concomitante (J7), l'élimination de la chlorzoxazone se fait plus lentement (en 8 heures) alors que le pic plasmatique est aussi atteint en 2 heures. L'isoniazide ralentit donc le métabolisme de la chlorzoxazone et, par conséquent, inhibe l'activité du CYP2E1.

Quarante huit heures après l'arrêt de l'isoniazide (J9), une nouvelle administration de chlorzoxazone se traduit par un pic plasmatique toujours atteint en 2 heures, mais moins élevé, ainsi que par une élimination plus rapide (4 heures environ).

Il semble donc que l'isoniazide agisse par un mécanisme d'inhibition-induction sur l'activité du CYP2E1. Le mécanisme de cet effet biphasique est probablement une induction par stabilisation protéique (il s'agit donc d'un mécanisme post-transcriptionnel) (33), ce qui provoquerait une inhibition de l'activité catalytique lorsque l'isoniazide est présent.

Le tableau III présente l'effet de l'administration d'isoniazide sur la clairance plasmatique totale de la chlorzoxazone.

Sujet n°	CL Chlorzoxazone (L/h)		
	J-4	J7	J9
1	13,4	5,9	21,8
2	8,0	2,8	12,7
3	14,4	5,2	17,1
4	10,9	4,6	16,4
5	13,0	4,9	27,4
6	9,0	3,6	21,1
7	9,2	6,4	22,3
8	11,5	5,4	19,5
9	24,3	5,7	19,7
10	12,5	10,3	19,0
Moyenne ± Ecart type	12,6 ± 4,6	5,5 ± 2,0*	19,7 ± 3,9

* p <0,001

Tableau III : Effet de l'administration d'isoniazide sur la clairance plasmatique totale de la chlorzoxazone (CL) (d'après 32)

Dans ce tableau, on observe que pour tous les sujets, la clairance totale de la chlorzoxazone diminue de manière significative (56%) quand elle est administrée avec l'isoniazide (J7), et augmente d'environ 56%, 48 heures après la dernière dose d'isoniazide (J9). Cependant, on observe une exception : le sujet 9 présente la CL la plus importante à J-4; cette clairance diminue à J7 mais contrairement aux autres sujets, à J9 elle est inférieure à celle de J-4.

Ceci est le reflet de l'importante variabilité individuelle dans l'activité du CYP2E1 : les facteurs environnementaux, tels que l'état physiologique, le statut hormonal et l'alimentation, sont déterminants (11).

➤ Cette étude a montré que l'apparente stabilisation du CYP2E1 par l'isoniazide provoquerait une inhibition de l'activité catalytique pendant que l'isoniazide serait lié à l'enzyme, et une diminution de l'activité entre le moment où l'isoniazide est éliminé et le moment où l'enzyme retourne à sa valeur basale (32,34). On peut donc penser que d'autres

inhibiteurs, agissant par un mécanisme de stabilisation protéique, peuvent avoir des effets similaires (32).

1.5.4 - Autres inhibiteurs

Il existe d'autres inhibiteurs du CYP2E1 mais les mécanismes d'inactivation n'ont pas encore été établis (35) : c'est le cas par exemple du 3-amino-1,2,4-triazole, de la dihydrocapsaïcine (présent dans le poivron rouge), du phénéthyl isothiocyanate (constituant du chou), ou encore du diallyl sulfide (entrant dans la composition de l'ail) (34,7).

2. MESURE DE L'ACTIVITE DU CYP2E1 : UTILISATION DE LA CHLORZOXAZONE

2.1 - TEST A LA CHLORZOXAZONE

Le CYP2E1 est responsable de la bioactivation de plusieurs composés suspectés d'être carcinogènes, tels que le *N*-nitrosodiméthylamine, l'aniline, les hydrocarbures fluorés, le benzène et les *N*-alkylformamides (36). L'activité catalytique du CYP2E1 pourrait être un important modulateur de la toxicité ou du pouvoir carcinogène de ces composés; par conséquent, une méthode atoxique et sûre d'évaluation de l'activité de cette enzyme chez l'homme, s'avère nécessaire.

La chlorzoxazone est un myorelaxant d'action centrale dont l'hydroxylation conduit à la formation de la 6-hydroxychlorzoxazone (qui est ensuite glucuroconjuguée puis éliminée) (37).

Cette réaction est essentiellement catalysée par le CYP2E1 *in vitro*, et la chlorzoxazone est largement utilisée comme marqueur de l'activité *in vivo* du CYP2E1; cependant, les caractéristiques de mesure et les doses utilisées varient largement (36).

Avant d'étudier la mesure de l'activité du CYP2E1, il est nécessaire de faire quelques rappels de pharmacocinétique (38) :

Définitions :

» La clairance plasmatique totale d'un médicament représente le volume de plasma complètement épuré du médicament par unité de temps. Elle est exprimée habituellement en unité de volume par unité de temps (ml/min ou ml/min/kg).

La clairance plasmatique totale constitue ainsi le paramètre cinétique qui rend compte des capacités d'élimination que possède l'organisme pour ce médicament. Elle est aussi la somme des diverses clairances d'organes (rein, foie, poumon....)

➤ La clairance hépatique d'un médicament, correspond au volume de sang hépatique totalement débarrassé du médicament par unité de temps. Elle s'exprime en unité de volume par unité de temps (ml/min ou ml/min/kg).

La clairance hépatique traduit la capacité de l'organisme à épurer un médicament par le foie. Elle résulte de deux clairances distinctes : la clairance métabolique hépatique ou clairance intrinsèque, correspondant à l'activité de biotransformation enzymatique du foie, et la clairance biliaire.

➤ La clairance rénale est la capacité de l'organisme à éliminer un médicament par voie urinaire. Elle s'exprime en unité de volume par unité de temps : ml/min ou ml/min/kg.

➤ Le volume apparent de distribution (Vd) d'un médicament représente un volume hypothétique dans lequel le médicament, uniformément réparti, est à la même concentration que celle mesurée dans le plasma. A l'état d'équilibre cinétique, il obéit à la formule suivante :

$$V(d) = \frac{\text{Quantité de médicament dans l'organisme}}{\text{Concentration de médicament dans le plasma}}$$

Calcul des principales constantes pharmacocinétiques :

Pour y parvenir, la méthode la plus simple consiste à administrer par voie intraveineuse ou orale, une dose unique du médicament à un groupe de volontaires sains, puis à prélever des échantillons de sang, régulièrement espacés au cours du temps suivant la prise du médicament. Le dosage des concentrations plasmatiques obtenues va permettre de bâtir une courbe représentant l'évolution de ces concentrations (en ordonnée) au cours du temps (en abscisse) et de calculer les constantes cinétiques suivantes :

➤ La concentration plasmatique est la quantité de médicament présente, à un instant t après l'administration, dans l'unité de volume plasmatique.

C_{max} : concentration plasmatique ou pic plasmatique est la valeur la plus haute ; elle se situe en général à la fin de la phase d'absorption et avant la phase d'élimination du produit.

T_{max} : représente le temps nécessaire, après administration du produit, pour atteindre le pic plasmatique.

» L'aire sous la courbe (AUC : Area Under Curve) est la surface délimitée par les axes et la courbe reliant les différentes concentrations au cours du temps. Elle représente la quantité de médicament qui se retrouve dans la circulation générale associée à la vitesse de son élimination. Elle s'exprime par le produit des unités de temps et de concentration (exemple : $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$)

» La demi-vie d'élimination est le temps nécessaire pour que la concentration du principe actif diminue de moitié pendant la phase d'élimination. Elle peut être également définie comme étant le temps nécessaire à l'élimination de la moitié de la quantité de principe actif présent dans l'organisme.

Les résultats d'une étude récente ont permis d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques de la chlorzoxazone et de son métabolite chez des volontaires sains et de valider ainsi un index phénotypique acceptable de la clairance de formation de la 6-hydroxychlorzoxazone (36).

Les sujets :

◆ Seize volontaires sains non fumeurs âgés de 18 à 38 ans, n'ayant pris aucun produit contenant de la caféine ou de l'alcool dans les 3 jours précédent l'étude et aucun médicament.

◆ Après une nuit de jeûne, les sujets ont reçu 250 mg de chlorzoxazone par voie orale. Six sujets ont reçu, en plus de cette dose, 750 mg de chlorzoxazone afin d'évaluer une éventuelle dose dépendance dans la biodisponibilité de la chlorzoxazone.

Le tableau IV présente les paramètres pharmacocinétiques de la chlorzoxazone et de la 6-hydroxychlorzoxazone.

Paramètres	Moyenne \pm écart type (limites)
Chlorzoxazone	
AUC ($\mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$)	$11,8 \pm 3,8$ (3,5-19,4)
$t_{1/2}$ (h)	$1,1 \pm 0,2$ (0,7-1,5)
Volume de distribution/F (l)	36 ± 13 (20-73)
Cl totale/F (ml/min/kg)	$5,1 \pm 2,3$ (3,0-12,6)
Cl autre (ml/min/kg)	$1,8 \pm 1,0$ (0,5-4,3)
6-hydroxychlorzoxazone	
AUC ($\mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$)	$5,5 \pm 1,2$ (3,6-7,5)
$t_{1/2}$ (h)	$1,4 \pm 0,4$ (0,8-2,3)
Récupération urinaire (mg)	159 ± 37 (97-220)
Cl formation (ml/min/kg)	$3,2 \pm 1,6$ (1,3-8,3)
Cl rénale (ml/min/kg)	$6,3 \pm 2,0$ (2,9-10,7)

AUC : aire sous la courbe; $t_{1/2}$: demi-vie d'élimination ; F : facteur de biodisponibilité; Cl : clairance

Tableau IV : Mesure des paramètres pharmacocinétiques de la chlorzoxazone et de la 6-hydroxychlorzoxazone après administration orale de 250 mg (N=16) (d'après 36).

La demi-vie d'élimination de la 6-hydroxychlorzoxazone ($1,4 \pm 0,4$ heures) est plus longue que celle de la chlorzoxazone ($1,1 \pm 0,2$ heures).

L'aire sous la courbe de la chlorzoxazone ($11,8 \pm 3,8 \mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$) est plus importante que celle de son métabolite ($5,5 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$).

La figure 3 (A) présente les courbes concentrations-temps de la chlorzoxazone et de la 6-hydroxychlorzoxazone après administration orale de 250 mg de chlorzoxazone.

La figure 3 (B) présente l'excrétion urinaire cumulative de la 6-hydroxychlorzoxazone en pourcentage de la dose de chlorzoxazone administrée.

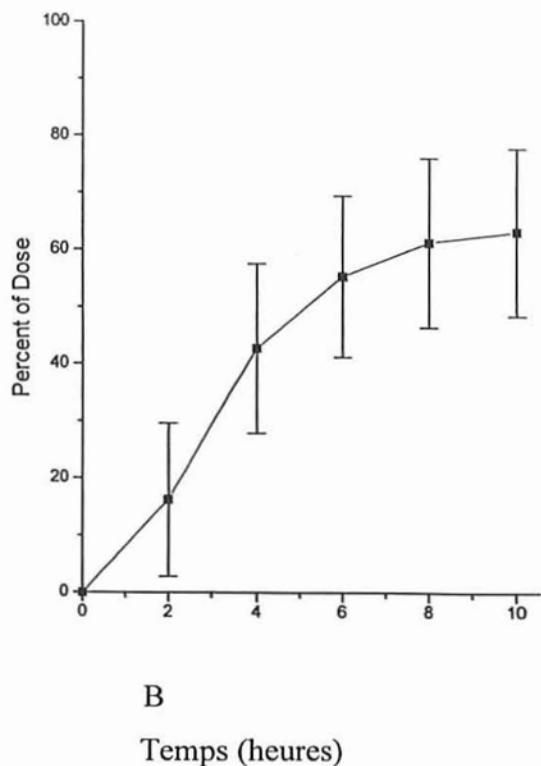
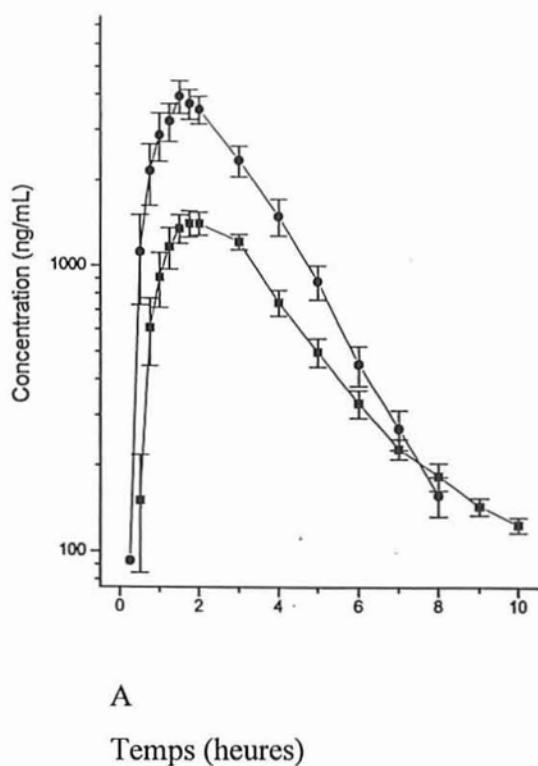


Figure 3 : (A) Concentrations en fonction du temps de la chlorzoxazone (●) et de la 6-hydroxychlorzoxazone (■) après une administration orale de 250 mg de chlorzoxazone chez 16 volontaires sains. (B) Excrétion urinaire cumulative de la 6-hydroxychlorzoxazone en % de la dose (d'après 36).

Après administration orale de 250 mg de chlorzoxazone, les pics plasmatiques sont atteints en 1 heure 30 pour la chlorzoxazone et 2 heures pour la 6-hydroxychlorzoxazone (figure 3 A)

La récupération urinaire de la 6-hydroxychlorzoxazone après 10 heures représente approximativement les deux tiers ($63,5 \pm 14,8\%$) de la dose administrée; cependant, cette récupération urinaire est l'objet d'une importante variabilité (figure 3 B).

Il n'y a pas de trace de chlorzoxazone inchangée dans les urines; environ 35 % de la dose ne sont pas récupérés, suggérant donc l'existence de mécanismes alternatifs dans le métabolisme de la chlorzoxazone ou une absorption incomplète.

Cette étude pharmacocinétique a été réalisée afin de valider un unique point de mesure d'index phénotypique de la clairance fractionnelle de la 6-hydroxychlorzoxazone.

Les rapports des concentrations plasmatiques de la 6-hydroxychlorzoxazone sur la chlorzoxazone à 2 et 4 heures montrent les plus fortes corrélations avec la clairance de formation de la 6-hydroxychlorzoxazone et, peuvent donc ainsi servir d'index de mesure de l'activité du CYP2E1.

La récupération urinaire totale de la 6-hydroxychlorzoxazone et l'index d'hydroxylation*, ne sont pas corrélés de manière significative avec la clairance de formation du métabolite.

* : rapport dose de chlorzoxazone sur la récupération urinaire de la 6-hydroxychlorzoxazone.

Pour évaluer une éventuelle dose dépendance dans la biodisponibilité de la chlorzoxazone, six des sujets de l'étude ont reçu en plus 750 mg de chlorzoxazone.

La mesure des paramètres pharmacocinétiques de la chlorzoxazone et de la 6-hydroxychlorzoxazone après administration des deux doses montre, une augmentation de 30% de l'aire sous la courbe de la chlorzoxazone après une dose de 750 mg par rapport à une dose de 250 mg. Bien que cette aire soit augmentée de manière significative, il n'y a pas de différence notable au niveau de l'aire sous la courbe de la 6-hydroxychlorzoxazone entre les deux doses, ce qui résulte d'une demi-vie d'élimination plus longue après une dose de 750 mg.

La figure 4 présente les courbes concentrations-temps de la chlorzoxazone et de la 6-hydroxychlorzoxazone après administration de 250 mg et de 750 mg de chlorzoxazone chez 6 des 16 sujets étudiés.

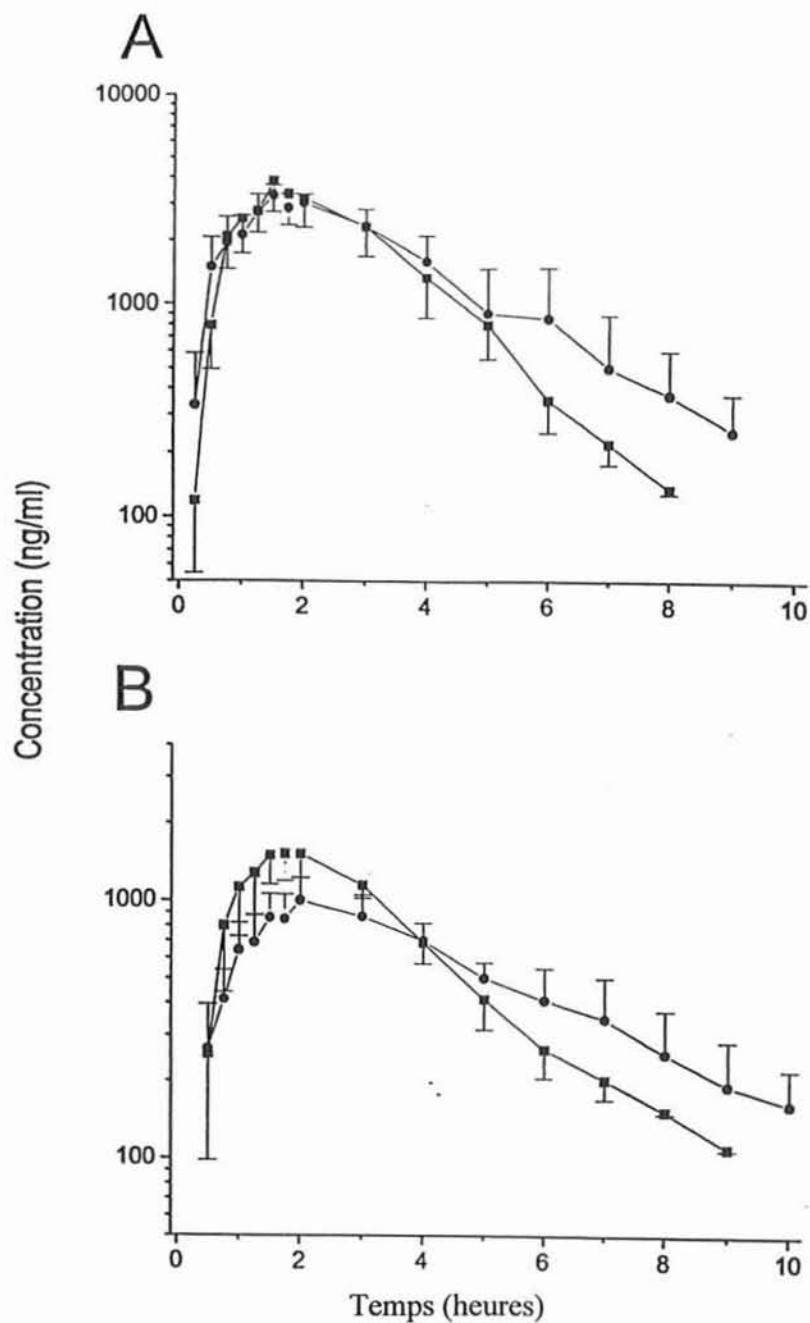


Figure 4 : Courbes concentration-temps de la chlorzoxazone (A) et de la 6-hydroxychlorzoxazone (B) après des doses de 250 mg (■) et de 750 mg (●) (d'après 36).

Quelle que soit la dose administrée (250 mg ou 750 mg), le pic plasmatique de la chlorzoxazone est identique et il est atteint en 1 heure 30.

Le pic plasmatique de la 6 hydroxychlorzoxazone est atteint en 2 heures pour les deux doses mais, il est plus important lorsque la dose administrée est de 250 mg.

La figure 5 illustre l'excrétion urinaire cumulative de la 6-hydroxychlorzoxazone en % de la dose après administration orale de 250 mg et 750mg de chlorzoxazone.

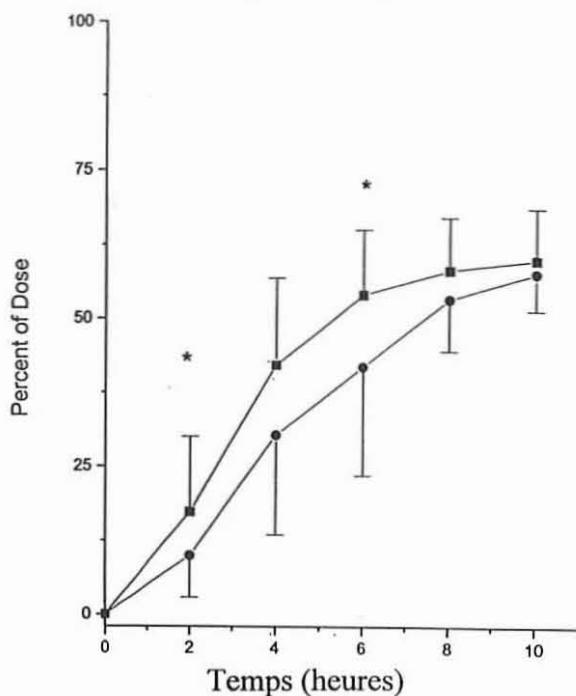


Figure 5 : Excrétion urinaire cumulative de la 6-hydroxychlorzoxazone en % de la dose après administration orale de 250 mg (■) et 750 mg (●) de chlorzoxazone (d'après 36). * p <0.05

Bien que la récupération urinaire totale de la 6-hydroxychlorzoxazone à 10 heures ne soit pas différente entre les 2 doses, la récupération fractionnelle après administration de 750 mg est plus faible les premières heures, suggérant que la clairance est saturée par ce mécanisme quand les doses de chlorzoxazone sont plus fortes, ce qui pourrait considérablement altérer les mesures de trait phénotypique à des doses élevées.

Ceci est illustré par une diminution d'environ 48% du rapport plasmatique de la 6-hydroxychlorzoxazone sur la chlorzoxazone à 4 heures chez 5 des 6 sujets.

➤ Les résultats de cette étude montrent qu'une dose de 250 mg de chlorzoxazone doit être utilisée et qu'un rapport plasmatique obtenu dans les 2 à 4 heures suivant l'administration, représente un index acceptable de la clairance de formation de la 6-hydroxychlorzoxazone et peut être utilisé pour évaluer le métabolisme *in vivo* de la chlorzoxazone et donc l'activité du CYP2E1 (36).

2.2 - VARIATIONS BIOLOGIQUES DU TEST

Le métabolisme de la chlorzoxazone, et donc l'activité du CYP2E1, peut être influencé par différents facteurs (39). Une étude incluant différents groupes d'individus a permis d'évaluer l'effet de diverses conditions physiopathologiques et de style de vie.

2.2.1 - Sujets

- L'activité du CYP2E1 a été mesurée en utilisant le test de la chlorzoxazone : après une nuit de jeûne, les individus ont absorbé 500 mg de chlorzoxazone avec un verre d'eau ou de jus de pamplemousse. Une prise de sang leur a été faite 2 heures après la prise de chlorzoxazone afin de mesurer le rapport métabolique de la chlorzoxazone (HCZX/CZX).

- Les sujets n'ont pris aucun médicament susceptible d'interférer avec l'activité du CYP2E1 avant le test (tels que le paracétamol, le disulfirame, ou l'isoniazide). La consommation tabagique et alcoolique a été évaluée au cours d'entretiens individuels (39).

♦sujets contrôles :

- 42 Français (21 hommes et 21 femmes);
- 11 Italiens (5 hommes et 6 femmes);
- 16 Mexicains (8 hommes et 8 femmes).

Ces personnes se sont abstenues de prendre de l'alcool durant les 5 jours précédent le test.

♦sujets alcooliques :

72 sujets (49 hommes et 23 femmes, dont la consommation alcoolique est de $162 \pm 65 \text{ g/j}$). Ces personnes ont été admises à l'hôpital pour une cure de désintoxication et ont participé au test de la chlorzoxazone le jour suivant leur admission à l'hôpital ("CYP2E1 induit par l'éthanol") et/ou après 21 jours d'abstinence alcoolique ("CYP2E1 non-induit"). Tous les patients "CYP2E1 induit par l'éthanol" avaient, au moment de leur admission, une alcoolémie

de 1.45g/l \pm 0.95, et le test de la chlorzoxazone a été réalisé après vérification de toute absence alcoolique sanguine.

♦ sujets fumeurs :

- 75 sujets fumant 23 ± 11 cigarettes par jour et non alcooliques;
- 35 sujets fumant 30 ± 12 cigarettes par jour et alcooliques.

♦ sujets obèses :

30 obèses dont 12 hommes et 18 femmes avec un BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$; parmi ces patients, 13 souffrent de diabète non insulino dépendant (DNID).

♦ sujets travaillant dans une entreprise de chaussure et soumis à différents solvants :

10 Mexicains (6 hommes et 4 femmes), exposés à différentes quantités de solvants volatils tels que le pentane, l'acétone, l'hexane, l'alcool isopropylique, le toluène et le xylène. Ces sujets ont également cessé toute absorption de boissons alcoolisées 5 jours avant le début du test.

2.2.2 - Résultats

L'effet de différentes conditions physiopathologiques et de style de vie sur le métabolisme de la chlorzoxazone, a été évalué au sein de plusieurs groupes d'individus.

2.2.2.1 - Effet du sexe sur le rapport métabolique de la chlorzoxazone chez des sujets alcooliques et non alcooliques (figure 6)

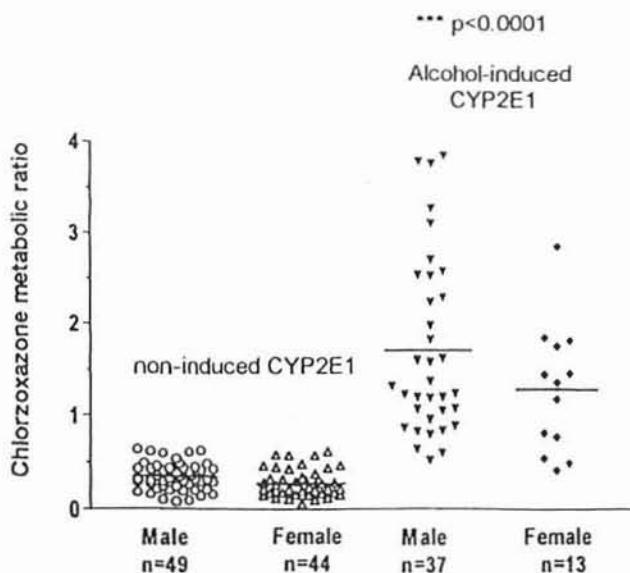


Figure 6 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone chez des hommes *versus* des femmes (d'après 39).

Les individus "CYP2E1 non-induit" regroupent les sujets contrôles sains (21 hommes et 21 femmes) et les alcooliques s'étant abstenus de boire depuis 21 jours (28 hommes et 21 femmes).

Le rapport métabolique de la chlorzoxazone chez les femmes est légèrement inférieur à celui des hommes, aussi bien chez les sujets non alcooliques ("CYP2E1 non induit") que chez les sujets alcooliques; cependant, la différence n'est statistiquement pas significative.

Des études antérieures ont suggéré que les femmes présentaient un plus faible rapport métabolique de la chlorzoxazone que les hommes.

➤ Le sexe ne constitue pas un réel facteur de variabilité de l'activité du CYP2E1.

Les sujets alcooliques présentent un rapport métabolique de la chlorzoxazone plus élevé que les sujets non alcooliques et ce, quel que soit le sexe.

➤ L'alcool provoque donc une augmentation du métabolisme de la chlorzoxazone et donc de l'activité du CYP2E1.

2.2.2.2 - Effet du tabagisme et de l'alcool sur le rapport métabolique de la chlorzoxazone (figure 7)

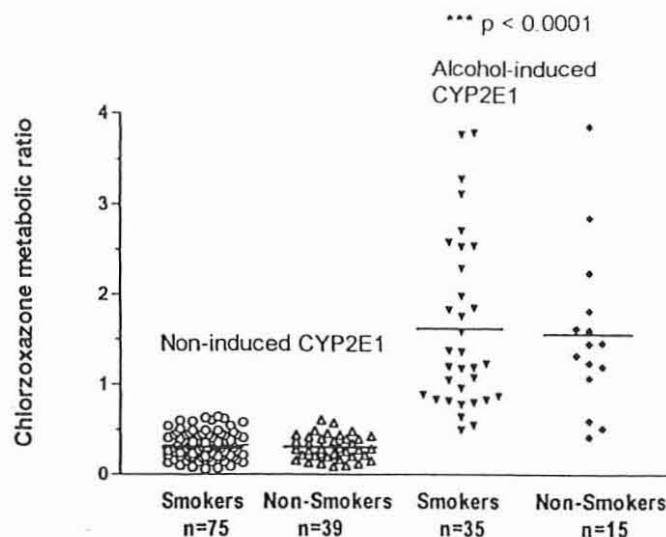


Figure 7 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone chez des fumeurs non alcooliques ("CYP2E1 non-induit") *versus* des non fumeurs, et chez des fumeurs alcooliques ("CYP2E1 induit") *versus* des non fumeurs.

Les individus "CYP2E1 non-induit" incluent les sujets contrôles sains (n = 23) et les alcooliques qui ont arrêté de boire depuis 21 jours (n = 52) (d'après 39).

Ce schéma montre que le tabac ne modifie pas de manière significative l'hydroxylation de la chlorzoxazone, aussi bien chez les fumeurs non alcooliques *versus* les non fumeurs que chez les fumeurs alcooliques *versus* les non fumeurs.

Par opposition, ces données montrent que l'alcool provoque une nette augmentation de cette réaction d'hydroxylation. En effet, le rapport métabolique de la chlorzoxazone chez les sujets alcooliques est plus élevé que chez les non alcooliques, que ce soit chez les fumeurs ou les non fumeurs.

D'autres études ont montré que le métabolisme de la chlorzoxazone était trois fois plus rapide chez des sujets alcooliques que chez des sujets qui se sont abstenus de boire de l'alcool et qui présentent un syndrome alcoolique hépatique (26). Chez ces derniers, on observe une diminution continue de l'activité du CYP2E1. Mais il reste à savoir si la cirrhose alcoolique hépatique conduit à une diminution de l'activité du CYP2E1, et donc à une altération du

métabolisme de la chlorzoxazone, ou si une lésion hépatique sévère est une conséquence de l'activité altérée du CYP2E1 (26).

D'autres études doivent être menées afin de déterminer si le métabolisme des drogues par le CYP2E1 est diminué chez tous les sujets présentant un stade de maladie hépatique avancé en dehors de toute étiologie. Néanmoins, il semble prudent de diminuer les posologies des médicaments substrats du CYP2E1 chez les patients souffrant de lésion hépatique sévère (26).

L'activité du CYPE1 est induite après une consommation chronique d'alcool mais retrouve sa valeur basale après 5 à 8 jours d'abstinence alcoolique chez des sujets alcooliques (5).

➤ Contrairement à l'alcool, le tabac n'a donc pas d'incidence sur l'activité du CYP2E1.

2.2.2.3 - Effet de l'obésité sur le rapport métabolique de la chlorzoxazone (figure 8)

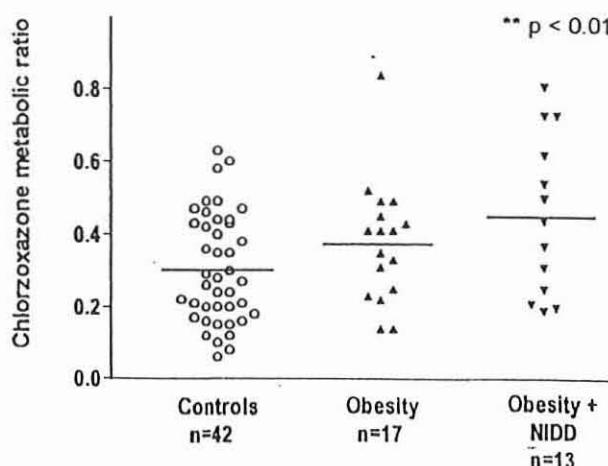


Figure 8 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone chez des sujets obèses avec ou sans DNID (d'après 39)

Cette figure montre que le rapport métabolique de la chlorzoxazone chez les sujets obèses est supérieur à celui des sujets contrôles (0,4 versus 0,3). Lorsque l'obésité est associée à un diabète non insulino dépendant, ce rapport devient encore plus important : 0,5 contre 0,3 chez les sujets contrôles.

Le CYP2E1 est impliqué dans le métabolisme des corps cétoniques et son activité peut être modifiée par l'obésité.

Dans cette étude, l'obésité augmente le rapport métabolique de la chlorzoxazone, notamment quand elle est associée à un diabète non-insulino dépendant (DNID).

➤ L'obésité et le diabète sont des facteurs physiopathologiques provoquant une induction du CYP2E1.

2.2.2.4 - Effet des solvants organiques sur le rapport métabolique de la chlorzoxazone (figure 9)

De nombreux produits volatils courants sont des inducteurs et des substrats du CYP2E1(5). Par conséquent, le métabolisme de la chlorzoxazone a été évalué chez des travailleurs exposés à des solvants organiques, tels que le toluène, le xylène, l'acétate d'éthyle et l'acétone dans une entreprise de fabrique de chaussures mexicaine.

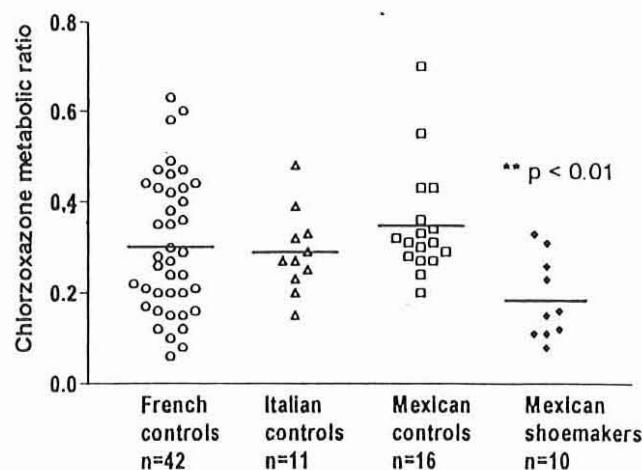


Figure 9 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone chez des travailleurs exposés à des solvants organiques volatils dans une fabrique de chaussures au Mexique (d'après 39).

En dépit d'habitudes alimentaires et de manières de vivre présumées différentes, aucune différence n'a été observée entre les sujets contrôles d'origine française, italienne ou mexicaine (39).

➤ L'exposition à des solvants organiques a pour conséquence une diminution significative du rapport métabolique de la chlorzoxazone suggérant que ces solvants sont probablement *in vivo* des substrats compétitifs du CYP2E1; comme tous ces produits sont sûrement présents en même temps dans le sang des sujets, il est probable qu'ils n'aient pas été complètement éliminés pendant la nuit. Par conséquent ils pourraient rentrer en compétition avec la chlorzoxazone pour le métabolisme par le CYP2E1 (39). Aucune corrélation n'a été observée entre les concentrations dans l'air de ces solvants et l'activité du CYP2E1, ce qui peut s'expliquer par la diversité qualitative et quantitative de ces solvants dans les différents lieux de travail, couplée aux différences inter-individuelles des taux de CYP2E1.

Cette étude permet de renforcer l'hypothèse selon laquelle la chlorzoxazone serait un marqueur biologique de l'exposition à des solvants organiques sur le lieu de travail (39).

2.2.2.5 - Effet du jus de pamplemousse sur le rapport métabolique de la chlorzoxazone

Le jus de pamplemousse est connu pour augmenter la disponibilité orale d'une variété de substrats du CYP3A4, incluant la félodipine (FLODIL LP[®]) et la nifédipine (ADALATE[®]) (39). Le mécanisme de cette augmentation de la biodisponibilité est supposé être soit une inactivation de l'enzyme par les composés du jus de pamplemousse, soit une autoinhibition de l'enzyme.

Dans le but d'évaluer la contribution du CYP3A4 dans l'hydroxylation de la chlorzoxazone, les individus ont reçu simultanément 500 mg de chlorzoxazone et 200 ml de jus de pamplemousse concentré.

La figure 10 illustre les résultats de l'administration concomitante de jus de pamplemousse et de chlorzoxazone chez 9 sujets contrôles.

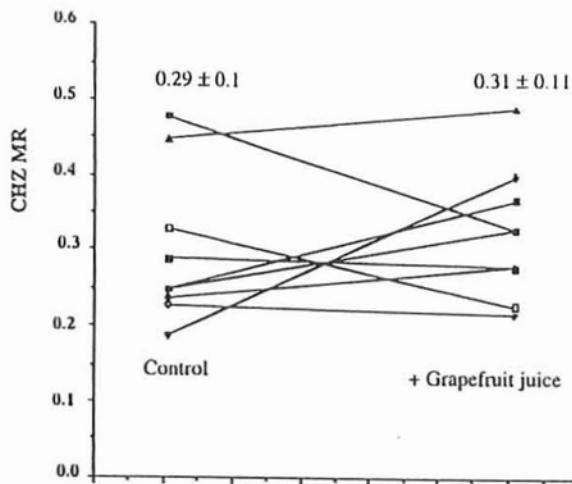


Figure 10 : Rapport métabolique de la chlorzoxazone chez 9 sujets contrôles ayant reçu 500 mg de chlorzoxazone seule et avec 200 ml de jus de pamplemousse (d'après 39).

L'administration concomitante de jus de pamplemousse et de chlorzoxazone ne modifie pas de manière significative le rapport métabolique moyen : $0,29 \pm 0,1$ versus $0,31 \pm 0,1$, respectivement sans et avec jus de pamplemousse, chez 9 sujets contrôles (39). La différence moyenne entre les deux groupes est de 8% (39).

En outre, une étude *in vitro* a montré que le jus de pamplemousse naturel concentré à 10%, était capable d'inhiber l'oxydation de la nifédipine, une activité spécifique du CYP3A4. Par opposition, la 6-hydroxylation de la chlorzoxazone, qui est spécifique du CYP2E1, n'est pas modifiée par ce même jus de pamplemousse.

Ces données suggèrent que le CYP3A4 inhibé par le jus de pamplemousse est peu impliqué dans le métabolisme de la chlorzoxazone, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (39).

➤ Cette étude permet de confirmer que la chlorzoxazone est un marqueur sélectif de l'activité du CYP2E1 chez l'homme. Le choix de la chlorzoxazone repose aussi sur son caractère sûr et son absence d'effet pharmacologique dans les conditions du test du CYP2E1.

Cependant, il existe de nombreux facteurs intervenant dans la régulation de l'activité du CYP2E1, qu'il est nécessaire de connaître afin d'interpréter correctement les résultats de mesure d'activité du CYP2E1. Ces facteurs sont essentiellement endogènes (état physiologique) et exogènes (39).

2.3 - REGULATION DE L'ACTIVITE DU CYP2E1

Il existe une grande variabilité inter-individuelle dans l'activité du CYP2E1 (34, 40). Cette observation repose sur des mesures *in vitro* (en utilisant des microsomes hépatiques) et des mesures *in vivo* (en utilisant la chlorzoxazone comme marqueur).

Les facteurs modulant l'activité du CYP2E1, et contribuant par conséquent à cette variabilité, peuvent être d'ordre physiopathologique (obésité, jeûne, dysfonctionnement hépatique), ou environnemental (induction par l'éthanol, inhibition par certains médicaments comme le disulfirame ou par des constituants alimentaires comme les isothiocyanates).

De plus, la régulation de l'expression du CYP2E1 survient à de multiples niveaux : transcription, stabilisation de l'ARNm, augmentation de la traduction de l'ARNm et stabilisation protéique (19). Une telle complexité dans la régulation peut être le reflet d'un important rôle endogène pour le CYP2E1 (41).

Il semble donc intéressant de déterminer le degré de cette variabilité (41) afin d'évaluer la susceptibilité individuelle à certaines maladies, ainsi que la toxicité des substrats du CYP2E1.

2.3.1 - Physiologique

2.3.1.1 - L'âge

Contrairement au sexe, l'âge est un facteur qui influence le taux hépatique de CYP2E1; ce dernier diminue en effet de 5% tous les 10 ans (42).

2.3.1.2 - L'alimentation

La consommation de fruits et de légumes est associée à un faible risque de développer certaines formes de cancer. Les mécanismes pouvant expliquer cette protection sont nombreux mais, dans la plupart des cas, l'inhibition des enzymes participant à l'activation des procarcinogènes est impliquée (34).

De plus, d'importantes études chez l'animal ont permis d'évaluer l'effet de composés alimentaires sur certaines isoformes de cytochrome. Par exemple, les isothiocyanates présents dans les choux de Bruxelles et les brocolis inhibent l'activité du CYP2E1; il en est de même

pour l'ail et ses préparations contenant différents composés organo-soufrés, ainsi que pour les constituants du thé noir et vert (43).

Chez l'homme, les données sont plus limitées. Il semblerait que le cresson de fontaine soit un inhibiteur potentiel de l'activité du CYP2E1 (34).

Une étude a montré que l'ingestion quotidienne de 500g de brocolis pendant 12 jours conduisait à une diminution de l'activité du CYP2E1 d'environ 19% (34).

Une autre étude réalisée chez 50 Japonais résidant à Hawaï (33 hommes et 17 femmes sains et non fumeurs) a montré que la consommation de brocolis et de thé noir était associée à une réduction de l'activité du CYP2E1, et que la consommation de laitue induisait le CYP2E1 (le mécanisme d'une telle induction est cependant inconnu) (34).

➤ Les recherches en diététique pourraient donc avoir des implications sur la prévention de certains cancers.

Le jeûne prolongé provoque une augmentation des corps cétoniques et altère la 6-hydroxylation de la chlorzoxazone, conduisant à une diminution du métabolisme et donc de l'activité du CYP2E1 (44).

L'infiltration de graisse dans le foie, la stéatose, constitue probablement un facteur de risque pour l'hépatotoxicité, liée à l'halothane ou au paracétamol, qui est connue pour être influencée par le niveau d'activité du CYP2E1 (45).

Afin d'évaluer l'effet du régime alimentaire et de la stéatose sur l'activité *in vivo* du CYP2E1, une étude a été réalisée chez 11 patients d'origine caucasienne (9 hommes et 2 femmes) présentant des tests de fonctionnement hépatique anormaux (45), tels que les décrit le tableau V.

Aucun sujet n'a pris de médicament susceptible de provoquer des lésions hépatiques ou d'influencer les activités cytochromes P450.

Un seul sujet (8) est fumeur (5 à 10 cigarettes par jour).

Après une nuit de jeûne, les tests standards de fonction hépatique ont été réalisés.

Le tableau V présente les caractéristiques biochimiques et physiques des patients au début de l'étude.

	Sexe	Age	Poids	BMI (kg/m ²)*	Médicaments (par jour)	AST (UI/l)*	ALT (UI/l)*	γGT (UI/l)*	Cholestérol (mmol/l)*	Triglycérides (mmol/l)*	Biopsie hépatique
Patients compliant											
1	M	48	87	30,1	-	36	73	62	5,2	1,9	Non
2	M	53	93	33,0	Timolol (collyre)	33	69	111	5,5	1,8	Non
3	M	53	101	32,2	Nisoldipine 5mg, Kardégic 160 mg, Lysanxia 10mg	29	53	138	6,5	1,7	Non
4	M	51	103,5	31,9	-	25	34	67	4,4	8,0	Non
5	M	36	89	29,1	Orazamide, 100mg	32	74	27	4,6	1,3	Oui
6	M	37	69,2	22,3	Vitamine C	37	79	125	6,4	1,0	Oui
Patients non compliant											
7	F	52	91	33,8	-	39	49	154	6,4	1,3	Oui
8	M	25	91,5	27,9	-	31	70	96	8,5	3,1	Non
9	M	64	100,5	32,4	-	38	65	452	5,2	1,7	Non
10	M	30	109,8	31,1	-	24	54	57	7,2	3,0	Non
11	F	45	77	29,7	Catapressan 0,05mg	21	52	32	4,3	1,4	Non

Tableau V : Caractéristiques biochimiques et physiques des patients au début de l'étude (d'après 45).

BMI : indice de masse corporelle; AST : aspartate aminotransférase; ALT : alanine aminotransférase; γGT : γ-glutamyl transférase;

* Valeurs physiologiques : BMI, 20-25kg/m²; AST, < 25UI/l; ALT, < 32 UI/l; γGT, < 45UI/l; cholestérol, 3,9-5,7mmol/l; triglycérides, ≤ 1,8mmol/l.

L'activité du CYP2E1 est évaluée grâce aux paramètres pharmacocinétiques de la chlorzoxazone (CZX) et de son métabolite (6-hydroxychlorzoxazone), après ingestion de 500 mg de chlorzoxazone. Cette activité est mesurée au début de l'étude et après deux mois de régime glucidique, consistant en une diminution de l'apport en mono et disaccharides.

Sur la base d'entretiens répétés avec un même diététicien (non informé sur les données cliniques et biochimiques des patients), six patients sur onze sont restés compliant au régime

Après deux mois de régime, les six patients compliant présentent une diminution de leur consommation énergétique totale avec une diminution de plus de 50% de leur consommation en mono et disaccharides et une augmentation de leur consommation protéique. Les cinq autres patients de l'étude ne présentent aucune modification de leurs habitudes alimentaires.

La figure 11 présente l'effet du régime glucidique chez les patients compliant et non compliant après administration orale de 500 mg de chlorzoxazone.

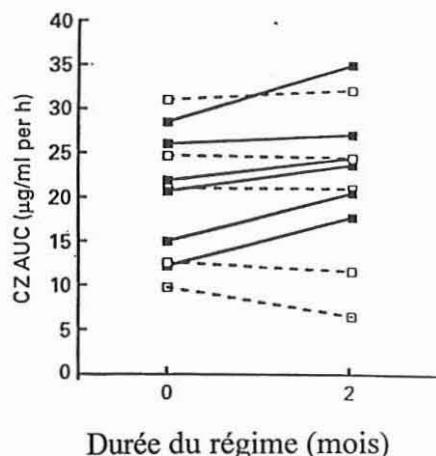


Figure 11 : Effet du régime glucidique chez les patients compliant (■—■) et non compliant (□---□) après administration orale de 500 mg de chlorzoxazone (d'après 45).

Cette figure montre que le régime glucidique chez les patients compliant, se traduit par une diminution significative de l'activité du CYP2E1 comme le montre l'augmentation significative de l'aire sous la courbe.

Le tableau VI compare certains paramètres chez les patients compliant et non compliant, au début de l'étude et après deux mois de régime glucidique.

		Au début de l'étude	Après deux mois
BMI (kg/m²)	Patients compliant	29,8 ± 3,9	28,1 ± 3,6
	Patients non compliant	30,0 ± 2,3	30,1 ± 1,9
ALT (UI/l)	Patients compliant	63,7 ± 17,0	41,7 ± 8,3
	Patients non compliant	52,6 ± 17,6	88,8 ± 17,8
CZX AUC (µg/ml/h)	Patients compliant	20,7 ± 6,3	24,7 ± 6,0
	Patients non compliant	19,8 ± 8,7	20,6 ± 11,2

BMI : indice de masse corporelle ; ALT : alanine amino transférase; CZX : chlorzoxazone

Tableau VI : BMI, ALT, et pharmacocinétique de la CZX chez les patients au début de l'étude et deux mois après prescription d'un régime glucidique (d'après 45).

Contrairement aux patients non compliant au régime, on observe chez les patients compliant une diminution du BMI, une diminution du taux sérique d'ALT, ainsi qu'une réduction de l'activité du CYP2E1. Cependant, chez ces patients, le BMI et le taux sérique d'ALT restent supérieurs aux valeurs physiologiques.

➤ En conclusion, un régime glucidique efficace permet, chez des patients présentant des activités sériques élevées d'enzymes hépatiques, une perte de poids et une réduction de l'activité du CYP2E1.

Les habitudes alimentaires devraient donc être prises en compte lors de l'évaluation de la fonction hépatique et de l'administration de xénobiotiques (45).

La variation d'activité du CYP2E1, observée chez les patients de l'étude, pourrait être directement liée au degré de stéatose et/ou à l'inflammation associée à la stéatose; en effet, les médiateurs de l'inflammation interviennent dans la régulation de certains cytochromes : c'est le cas par exemple de l'interleukine 4 qui induit l'expression et l'activité du CYP2E1 (45).

Cependant, les patients de cette étude sont pour la plupart obèses (10 sujets sur 11 ont un BMI > 25 kg/m²), ils présentent également des activités d'enzymes hépatiques nettement supérieures aux valeurs physiologiques. Leur cholestérolémie est également élevée ainsi que leur taux de triglycérides.

2.3.2 - Pathologique

2.3.2.1 - Le diabète

Chez des sujets souffrant de diabète insulino-dépendant, le taux de CYP2E1 est élevé dans les lymphocytes et le degré d'induction du CYP2E1 détecté dans ces cellules dépend de la sévérité du dysfonctionnement métabolique (46). On peut donc penser que ces personnes ayant des taux élevés de CYP2E1, peuvent présenter un risque plus important d'hépatotoxicité liée au paracétamol ou à l'isoniazide, ou être plus sensibles à ces agents potentiellement hépatotoxiques.

2.3.2.2 - L'obésité

Plusieurs études comparant l'activité du CYP2E1 (par mesure de la clairance de la chlorzoxazone) chez des sujets obèses et non-obèses, ont montré que le CYP2E1 est induit chez les sujets obèses, mais le mécanisme d'une telle induction n'est pas clairement défini (44).

L'obésité est l'une des conditions physiopathologiques conduisant à une induction du CYP2E1; en conséquence, les sujets obèses sont exposés à un plus fort risque de toxicité liée au métabolisme de composés exogènes par le CYP2E1 (44). De plus, l'efficacité d'un médicament qui est un substrat du CYP2E1, peut être diminuée chez ces patients.

Le tableau VII présente l'influence de l'obésité sur l'activité du CYP2E1 et le métabolisme de certains substrats de CYP2E1.

Substrats	Sujets		Mesures	Résultats		
	BMI (kg/m ²)			Obèses	Non obèses	
	Obèses	Non obèses		Obèses	Non- obèses	
Chlorzoxazone	(9) 35-50	(9) 21-30	Clairance orale (ml/min/kg)	6,23 ± 1,7*	4,15 ± 0,81*	
Enflurane (1)	(26) 46 ± 2	(8) 23 ± 2	Conc max Fl (μM)	27,8 ± 2,0**	17,0 ± 3,0**	
	(24) 46 ± 2	(7) 24 ± 2		28,0 ± 1,9**	17,3 ± 1,3**	
Sévoflorane (2)	(15) 29,4 ± 0,8	(16) 22,1 ± 0,4	Conc Fl	↗**	—	
	(13) 41 ± 1	(10) 26 ± 1		↔ NS	—	
Méthoxyflurane (3)	(19) 153 ± 9,6♦	(17) 71,9 ± 4,9♦	Conc Fl	↗*	—	
Halothane (4)	(17) 45 ± 1	(8) 22 ± 2	Conc TFA et Conc Br 48h et 72 h après administration d'halothane (μM)	↗*	—	
			Conc max Br (μM)	1311 ± 114**	787 ± 225**	

BMI : indice de masse corporelle; Conc : concentration sérique; Fl : fluorure; Br : bromure; Conc max : concentration sérique maximale; TFA : acide trifluoro acétique.

* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; NS : non significatif ; ♦ : poids en kg

(1), (2), (3), (4) : anesthésiques halogénés.

Tableau VII : Influence de l'obésité sur le métabolisme de certains substrats du CYP2E1
(d'après 47)

Ce tableau montre que l'activité du CYP2E1 est augmentée chez les sujets obèses ; en effet, la clairance de la chlorzoxazone et le métabolisme des anesthésiques halogénés sont augmentés chez ces sujets. Cependant, certaines données sont contradictoires : dans le cas du sévoflurane, une première étude a montré qu'il n'y avait pas de différence significative dans les concentrations sériques de fluorure entre les deux groupes , contrairement à une seconde étude. Des facteurs, tels que la dose de sévoflurane administrée, le degré d'infiltration d'acides gras au niveau hépatique et le type d'intervention chirurgicale, peuvent expliquer les divergences observées.

3. POLYMORPHISME GENETIQUE

3.1 - DEFINITION DU POLYMORPHISME

Le polymorphisme est la coexistence au sein d'une population de deux phénotypes, ou plus, attribuable le plus souvent à la présence de deux allèles (ou plus) du même gène (48).

Le gène du *CYP2E1* n'est pas particulièrement polymorphique, la région codante du gène est hautement conservée (41,49).

3.2 - LOCALISATION DU *CYP2E1* SUR LE GENOME

Chez l'homme, un seul gène a été détecté dans la sous-famille du *CYP2E1*. Il comporte neuf exons* et neuf introns* et il est localisé sur le chromosome 10 (13).

La localisation du gène du *CYP2E1*, sur le chromosome, est 10q24.3 et le gène comprend plus de 14761 paires de bases.

La figure 12 présente la structure exon-intron du gène du *CYP2E1*.

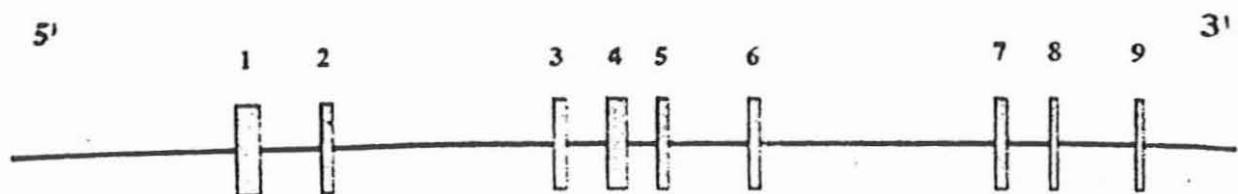


Figure 12 : Représentation schématique du gène du *CYP2E1* (d'après 50) :

* exons : séquences d'ADN contenant l'information héréditaire et qui en général s'expriment en étant traduites en protéines.

* introns : séquences d'ADN qui sont interposées au milieu de la partie contenant l'information; elles seront transcrrites mais pas traduites.

La fréquence de ces variants était également faible et aucune association n'a été démontrée entre ces mutations et la cirrhose alcoolique hépatique (10).

Les résultats de cette étude montrent que les polymorphismes génétiques au niveau du cadre de lecture ouvert du gène du *CYP2E1* ne sont probablement pas responsables des différences interraciales dans l'expression du *CYP2E1*(10).

⇒ screening de tous les exons et jonctions intron-exons du gène du *CYP2E1* à partir d'échantillons d'ADN obtenus chez 198 individus (51) :

♦ Sujets :

- 78 Chinois contrôles;
- 78 Suédois contrôles;
- 42 Italiens souffrant de cirrhose alcoolique.

♦ L'analyse des échantillons révèle la présence de deux variants alléliques :

Le tableau IX représente les variants alléliques observés dans les populations étudiées.

Population étudiée	Substitution d'acide aminé	
	G1168A (<i>CYP2E1*2</i>)	G10059A (<i>CYP2E1*3</i>)
	Nombre d'allèles	
Chinois contrôles (n = 78)	2	0
Suédois contrôles (n=78)	0	0
Italiens cirrhotiques (n=42)	0	1

Tableau IX : Distribution des variants alléliques au sein de trois populations différentes étudiées (d'après 51).

- L'allèle *CYP2E1*2* avec une mutation sur l'exon 2 (G1168A) cause une substitution d'acide aminé (R73H).
- L'allèle *CYP2E1*3* présente une mutation sur l'exon 8 (G10059A) provoquant un autre changement d'acide aminé (V389I)

Aucun variant allélique n'a été trouvé au sein de la population italienne.

L'allèle sauvage est l'allèle *CYP2E1*1*.

Pour évaluer l'importance fonctionnelle de ces mutations, les ADNc du CYP2E1 ont été construits puis sous-clonés dans un vecteur et enfin exprimés dans des cellules COS-1(51).

Les taux cellulaires d'ARNm du CYP2E1, de protéine du CYP2E1 et le taux d'hydroxylation de la chlorzoxazone ont été monitorés (51).

Le variant ADNc *CYP2E1*2* conduit à une diminution de l'expression protéique et de l'activité catalytique, sans modification du taux d'ARNm.

Cependant, ces résultats obtenus au niveau des ADNc ne peuvent pas être extrapolés à la situation *in vivo* et nécessitent donc d'être confirmés *in vivo* en réalisant une analyse phénotypique avec la chlorzoxazone chez des sujets porteurs de l'allèle *CYP2E1*2*, en comparaison avec des sujets homozygotes pour l'allèle sauvage (*CYP2E1*1*) (51).

➤ Ces variants alléliques sont rares, ce qui montre que la région codante du gène du *CYP2E1* est bien conservée, aussi bien chez les Asiatiques que chez les Caucasiens (51).

Le CYP2E1 pourrait donc avoir un important rôle endogène chez l'homme.

⇒ étude chez 36 femmes Afro-Américaines en âge de procréer (19) :

◆ Analyse des échantillons d'ADN :

La figure 13 représente la carte de restriction de la région en amont du gène du *CYP2E1* en utilisant l'enzyme de restriction *XbaI*

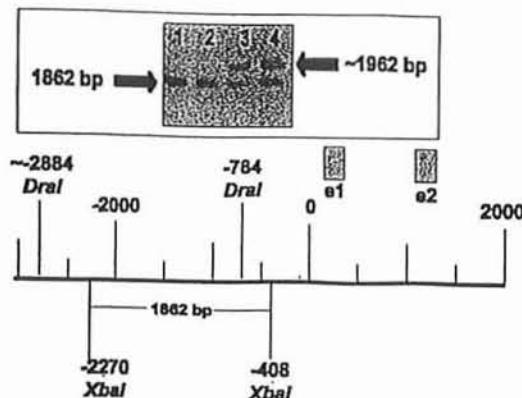


Figure 13 : Carte de restriction de la région en amont du gène du *CYP2E1* en utilisant l'enzyme de restriction *XbaI* (d'après 19).

L'utilisation de l'enzyme de restriction *XbaI* a permis de montrer que 25 sujets (69%) sont homozygotes pour la bande comprenant 1862 paires de bases depuis les positions -2270 jusqu'à -408.

Onze sujets (31%) ont cette même bande de 1862 paires de bases, mais également une plus grande bande d'environ 1962 paires de bases.

La figure 14 présente la carte de restriction de la région en amont du gène du *CYP2E1* en utilisant l'enzyme de restriction *Drai*.

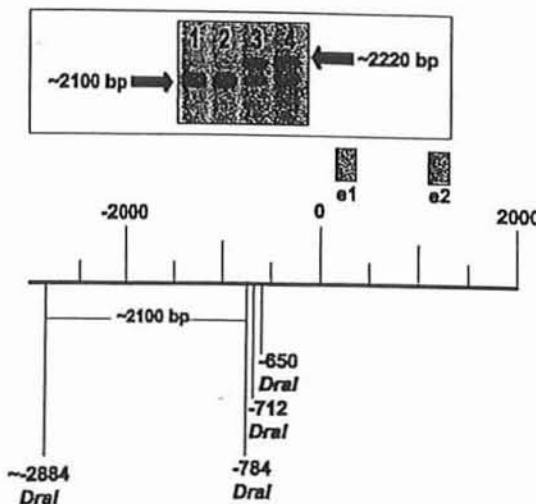


Figure 14 : Carte de restriction de la région en amont du gène du *CYP2E1* en utilisant l'enzyme de restriction *Drai* (d'après 19).

Les résultats de l'analyse par l'enzyme de restriction *DraI* confirment ceux observés avec l'enzyme *XbaI* : les sujets ayant le type sauvage d'après l'analyse *XbaI*, présentent un fragment d'environ 2100 paires de base après coupure par l'enzyme *DraI*, situé approximativement au niveau des positions -2884 et -784.

La combinaison de ces résultats permet de situer la mutation entre les positions -2270 et -784. Afin de localiser le site de la mutation, d'autres analyses ont été réalisées en utilisant d'autres enzymes de restriction (*RsaI*, *SpeI*, *Apal*, *StuI*) ; ce qui a permis de limiter la région de l'insertion aux positions allant de -2270 à -1672.

♦ Influence sur l'activité du CYP2E1 :

L'impact potentiel de l'insertion de cette mutation est évalué en déterminant l'index d'hydroxylation de la chlorzoxazone.

La figure 15 représente la relation entre la présence de la mutation et l'activité du CYP2E1.

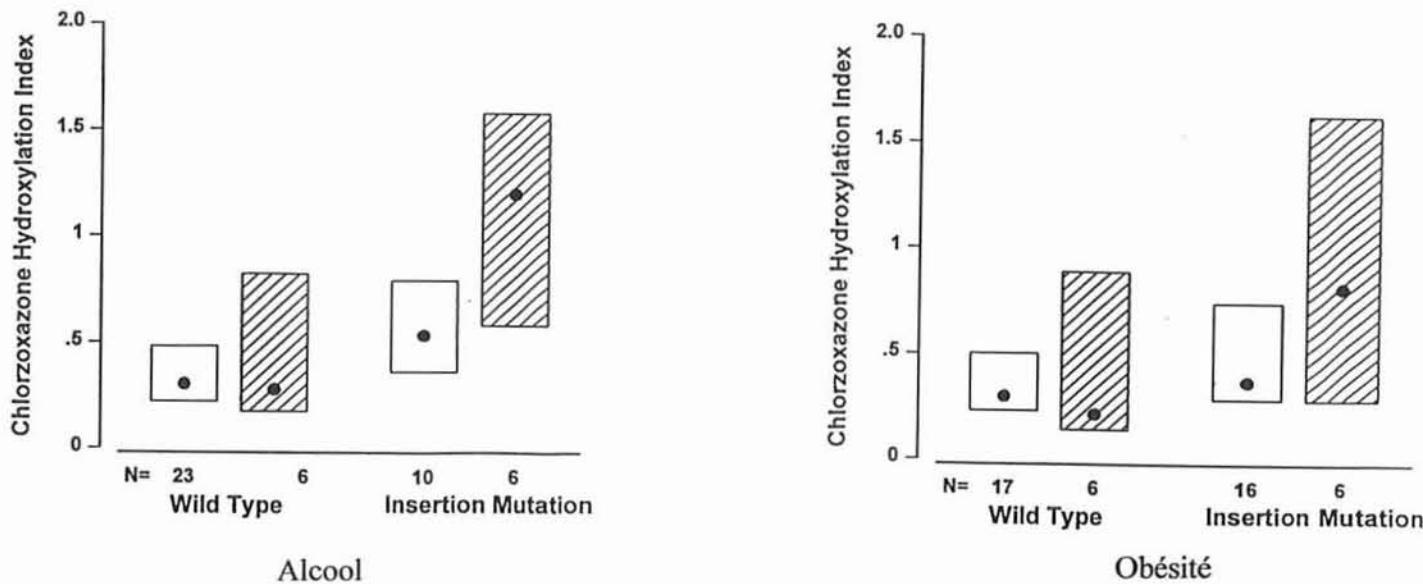


Figure 15 : Relation entre la présence de l'insertion de la mutation et l'activité métabolique du CYP2E1, décrite selon le rapport métabolique de la chlorzoxazone à 3 heures en présence d'alcool (cases hachurées) et d'obésité (cases hachurées) (d'après 19).

Cette mutation est associée à une augmentation du métabolisme de la chlorzoxazone, mais cet effet n'est observé qu'en présence d'obésité ou de consommation d'alcool dans les 3 jours précédent l'étude.

Afin de déterminer si cette mutation est spécifique aux Afro-Américains et de définir l'incidence de cette mutation, des analyses RFLP ont été réalisées sur des échantillons d'ADN issus de 58 Caucasiens et de 35 Afro-Américains en utilisant les enzymes de restriction *Dra*I et *Xba*I (19) :

Chez les Afro-Américains, 10 personnes (31%) sont hétérozygotes pour la mutation. L'incidence de la mutation est moins importante chez les Caucasiens, avec seulement 4 personnes (6.9%) hétérozygotes ; le reste étant homozygote (19).

➤ La fréquence relativement élevée de la mutation précédemment décrite au sein de la population Afro-Américaine, qui est un groupe présentant un risque élevé de susceptibilité à des toxiques, supposée liée au CYP2E1, donne un poids supplémentaire à l'importance potentielle de cette mutation dans la susceptibilité aux maladies (19). En outre, la fréquence élevée de cet allèle parmi les Afro-Américains, confirme les observations de cette étude sur une plus grande variation du métabolisme *in vivo* de la chlorzoxazone chez les Afro-Américains par rapport à des populations Caucasiennes et Asiatiques (19).

⇒ une étude portant sur l'analyse d'échantillons d'ADN issus de 40 sujets Caucasiens a permis de détecter de nouveaux polymorphismes au niveau du gène du *CYP2E1* :

Le tableau X représente les polymorphismes détectés chez les sujets étudiés

Substitution de base	Localisation sur le gène CYP2E1	Enzymes de restriction
A-316G	Séquence en amont (upstream)	<i>Bfa</i> I
T-297A	Séquence en amont (upstream)	<i>Bsp</i> MI
G-35T	Séquence en amont (upstream)	<i>Dde</i> I
G1107C	Intron 1	<i>Hpa</i> I
G4804A	Exon 4	<i>Tai</i> I
C10157T	Exon 8	<i>Mse</i> I

Tableau X : Nouveaux polymorphismes au niveau du gène du *CYP2E1* (d'après 49)

Parmi ces polymorphismes, la mutation silencieuse sur l'exon 8, le changement de base sur l'intron 1 (G1107C) ainsi qu'au niveau de la région en amont 5' (T-297A et A-316G) ne semblent pas être significatifs d'un point de vue fonctionnel (49). Mais le polymorphisme G-35T semble quant à lui associé à une légère augmentation de l'activité de transcription *in vitro*. Cependant son effet précis sur l'activité *in vivo* du CYP2E1 nécessite des études complémentaires (49).

3.4.2 - Influence du polymorphisme du site *Rsa*I sur l'activité du CYP2E1 et sur l'inductibilité par l'alcool ?

Des études *in vitro* ont révélé que ce variant allélique était associé à une augmentation de l'activité de transcription du CYP2E1 (49) et certains auteurs ont suggéré que les individus hétérozygotes ou homozygotes, pour ce variant allélique, présentent une plus grande susceptibilité au syndrome alcoolique hépatique, ce qui serait compatible avec une activité plus élevée du CYP2E1 (49).

Le génotype homozygote c2c2 présente, *in vitro*, une élévation de l'activité de transcription (52). Ce qui pourrait expliquer les différences observées chez les individus au

niveau de l’oxydation microsomale de l’éthanol. Le métabolisme de l’éthanol par le CYP2E1 produit de l’acétaldéhyde et des radicaux libres, capables de peroxyder les membranes lipidiques. Par conséquent, l’augmentation du taux enzymatique, suite à l’induction par l’éthanol et l’élévation de l’activité de transcription du CYP2E1, pourraient jouer un rôle dans le développement d’un syndrome alcoolique sévère (52).

3.5 - FREQUENCES ALLELIQUES OBSERVEES AU SEIN DE DIFFERENTES POPULATIONS

De nombreuses études réalisées au sein de diverses populations, ont permis d'évaluer les fréquences alléliques du site polymorphique *RsaI* du *CYP2E1*.

3.5.1 - Population saine

Le tableau XI présente les fréquences alléliques du site *RsaI* rencontrées au sein de populations saines d'origine ethnique différente.

Groupes ethniques	Nombre de sujets	Fréquences alléliques		Références
		c1	c2	
Caucasiens	32	0,980	0,020	in (52)
Suédois	148	0,950	0,050	in (53)
Anglais	100	0,985	0,015	in (54)
Espagnols	178	0,975	0,025	in (55)
Européens-Américains	449	0,960	0,040	in (53)
Afro-Américains	126	0,990	0,010	in (53)
Chinois	100	0,750	0,250	in (53)
Japonais	202	0,807	0,193	in (53)
	75	0,800	0,200	in (56)
	60	0,817	0,183	in (9)

Tableau XI : Fréquences alléliques du site *RsaI* au sein de différentes populations.

3.5.2 - Population alcoolique

Dans ce groupe d'individus, les sujets alcooliques présentent différents signes de lésions hépatiques liées à l'alcool.

Le tableau XII présente les fréquences alléliques du site *RsaI* chez des sujets alcooliques originaires de différents pays.

Groupes ethniques		Nombre de sujets	Fréquences alléliques		Références
			c1	c2	
Caucasiens	avec syndrome hépatique	53	0,950	0,050	in (52)
	sans syndrome hépatique	39	0,950	0,050	in (52)
Anglais	avec un syndrome hépatique alcoolique sévère	95	0,900	0,100	in (54)
Espagnols	avec carcinome hépatocellulaire	101	0,945	0,055	in (55)
Chinois	avec hépatite cirrhotique	31	0,790	0,210	in (53)
	avec pancréatite alcoolique	23	0,783	0,217	in (53)
	avec syndrome non hépatobiliaire	33	0,803	0,197	in (53)
	avec cirrhose alcoolique	54	0,759	0,241	in (53)
Japonais	Alcooliques	80	0,806	0,193	in (9)
		46	0,720	0,297	in (9)
		34	0,869	0,130	in (9)
		53	0,810	0,190	in (56)

Tableau XII : Fréquences alléliques du site *RsaI* chez des alcooliques de nationalité différente.

Ces deux tableaux montrent que la fréquence de l'allèle c2 varie selon les différentes populations : l'allèle c2 est plus fréquent chez les Chinois et les Japonais que chez les Afro-Américains, les Anglais, les Espagnols, les Suédois et les Européo-Américains et ce, aussi bien chez les sujets alcooliques que chez les sujets non alcooliques.

Dans la population chinoise, la distribution des fréquences alléliques entre les sujets alcooliques et les sujets sains ne diffère pas de manière significative, ce qui suppose que le polymorphisme *RsaI* du *CYP2E1* n'affecte pas la prédisposition génétique à l'alcoolisme chez les Chinois (53).

Chez les Caucasiens, il n'y a pas de différence dans les fréquences alléliques entre les alcooliques avec syndrome hépatique et les alcooliques sans syndrome hépatique (52). De même, aucune différence significative n'est observée entre les alcooliques et les sujets non alcooliques.

Une étude plus restreinte au sein d'une population Nord-Américaine n'a prouvé aucune association entre le syndrome alcoolique hépatique et le polymorphisme *RsaI* (54).

➤ Les divergences observées entre les différentes études peuvent être liées à des dissemblances cliniques chez les patients étudiés, ainsi qu'aux différences de fréquences alléliques au sein des populations (54).

3.6 - SUSCEPTIBILITE A L'ALCOOL

Le CYP2E1 est partiellement responsable du stress oxydatif et les radicaux oxygénés générés par cette enzyme sont capables de provoquer une peroxydation lipidique avec une production concomitante d'aldéhydes cytotoxiques (51). Ces différents produits sont impliqués dans l'hépatotoxicité due à l'alcool.

Ainsi, tout polymorphisme fonctionnel de cette enzyme pourrait être un important facteur dans la détermination du risque relatif d'hépatotoxicité liée à l'alcool, de toute forme de cancer ou de la susceptibilité à la toxicité des drogues (51).

La stéatose hépatique, l'hépatite et la cirrhose alcooliques sont de sévères manifestations du syndrome alcoolique hépatique (26).

Le fait que seule une faible proportion d'alcooliques (10 à 20%) développe une cirrhose du foie, suggère une prédisposition génétique (52, 54, 57).

Le CYP2E1 semble avoir un lien avec la susceptibilité individuelle aux effets hépatotoxiques de l'alcool (26). Cependant, les résultats des études, associant le polymorphisme génétique du CYP2E1 et la susceptibilité au syndrome alcoolique hépatique, sont contradictoires.

Le CYP2E1 représente l'enzyme clé dans le système d'oxydation non-ADH produisant une cytotoxine : l'acétaldéhyde (56, 26).

Il existe chez l'homme une grande variabilité inter-individuelle dans les taux d'ARNm et de protéine du CYP2E1 (13), ce qui pourrait expliquer les différences inter-individuelles dans la susceptibilité aux carcinogènes activés par le CYP2E1. Une telle variabilité pourrait être due soit aux polymorphismes génétiques observés au niveau du gène du CYP2E1, soit à une inductibilité variable par les xénobiotiques (5, 13).

3.6.1 - Implication du polymorphisme *RsaI* dans le syndrome alcoolique hépatique ?

Ce polymorphisme est situé à -1019 paires de bases dans la région régulatrice du gène du CYP2E1 et il reconnaît une substitution de nucléotide : 1019 (C→T). Des expériences de transfection ont montré que cette mutation est responsable d'une **multiplication par dix** de l'activité de transcription (54).

De même, il a été démontré que les taux d'ARNm du CYP2E1 dans les lymphocytes d'individus présentant un génotype hétérozygote c1c2, étaient **1,7 fois plus élevés** que dans les lymphocytes d'individus de génotype sauvage c1c1 (54).

Au niveau hépatique, le génotype c1c2 est associé à une augmentation du taux d'ARNm, de protéine et d'activité fonctionnelle du CYP2E1, par rapport au génotype c1c1. De plus, chez les sujets porteurs de l'allèle mutant, on peut supposer qu'une activité plus importante du CYP2E1 puisse résulter en une augmentation de la conversion d'alcool en intermédiaires toxiques (54).

Le CYP2E1 métabolise l'alcool en acétaldéhyde, un composé hautement réactif, impliqué dans la pathogénicité du syndrome hépatique alcoolique. Cependant, le CYP2E1 métabolise l'acétaldéhyde en un composé moins réactif : l'acide acétique. En effet, le CYP2E1 présente une plus forte affinité pour l'acétaldéhyde que pour l'éthanol. Il est intéressant de noter que le CYP2E1 a plus tendance à générer des réactifs oxygénés que les autres isoformes de cytochromes P450. Contrairement à l'alcool déshydrogénase, le CYP2E1 métabolise efficacement l'alcool en radicaux libres hydroxyéthyles qui, en alkylant les protéines hépatiques, pourraient initier des lésions hépatiques (54).

En conséquence, les patients avec l'allèle mutant, en raison d'une activité élevée du CYP2E1, pourraient présenter une forte quantité de radicaux libres. Les mécanismes de détoxification sont donc débordés, ce qui provoqueraient des lésions hépatiques (54).

3.6.2 - Etudes associant polymorphisme du site *RsaI* et susceptibilité à l'alcool

L'allèle c2 est associé à une activité plus faible du CYP2E1 (34) ; de nombreuses études ont suggéré que le risque de développer des cancers du foie ou de l'oesophage était réduit chez les individus porteurs de l'allèle c2, ce qui est compatible avec un taux réduit d'activation des procarcinogènes par le CYP2E1 (34).

Cependant, d'autres études n'ont pu mettre en évidence une telle association, ce qui reflète probablement les limites du pouvoir statistique et le manque d'ajustement de certains facteurs de variabilité du CYP2E1 (34).

Des études chez des Japonais ont montré qu'il existait une association entre la possession de l'allèle c2 et le risque de syndrome alcoolique, alors que d'autres études ont montré que l'allèle c1 était plus présent chez des alcooliques ayant une fibrose que chez des alcooliques n'en ayant pas (24).

L'interprétation d'études similaires a été limitée chez les Caucasiens en raison de la rareté de l'allèle c2 au sein de cette population; certaines études ont rapporté soit une association, soit une absence d'association entre l'allèle c2 et le syndrome alcoolique (24).

D'autres études chez des Japonais, sur le polymorphisme de site RsaI ont révélé des résultats contradictoires : l'une a montré une association entre l'allèle c2 et la maladie alcoolique hépatique, une autre a montré une association de l'allèle c1 avec le syndrome alcoolique (54, 24). D'autres enfin, ont montré que les sujets alcooliques porteurs de l'allèle c1 étaient plus sensibles à la cirrhose alcoolique, mais l'explication d'un tel phénomène n'est pas encore connue (9).

Il semble donc que ni les études chez les Japonais, ni les études chez les Caucasiens, ne mettent en évidence une association entre l'allèle c2 et l'alcoolisme (24).

➤ Le syndrome alcoolique hépatique constitue un dysfonctionnement multifactoriel et hétérogène comme le montrent les résultats de ces différentes études. Des facteurs génétiques combinés à l'influence variable de l'environnement peuvent être impliqués dans la détermination de la susceptibilité au syndrome alcoolique hépatique.

CONCLUSION

Le CYP2E1 est impliqué dans le métabolisme de nombreux composés endogènes et exogènes. L'éthanol est l'un des plus importants composés métabolisés par le CYP2E1 et sa consommation chronique contribue à l'induction de cette enzyme.

L'activité du CYP2E1 est mesurée en utilisant la chlorzoxazone, substance myorelaxante. Les résultats de l'étude ont montré qu'une dose de 250mg de chlorzoxazone doit être utilisée, et qu'un rapport plasmatique de la chlorzoxazone (HCZX/CZX) obtenu dans les 2 à 4 heures suivant l'administration, permettent d'évaluer l'activité du CYP2E1. Cette activité peut être influencée par différents facteurs (alcool, solvants organiques) et sa régulation peut être d'ordre physiologique (âge, alimentation) ou pathologique (diabète, obésité).

Plusieurs polymorphismes ont été détectés sur le gène du *CYP2E1* et de nombreuses études ont été réalisées au sein de différentes populations afin d'établir une éventuelle association entre le polymorphisme génétique du CYP2E1 et la susceptibilité à l'alcool.

Le polymorphisme du site *RsaI* a été l'objet de plusieurs études mais ces dernières ne sont pas consensuelles. Certaines ont mis en évidence une association entre polymorphisme génétique et syndrome alcoolique; d'autres, pas.

La principale difficulté rencontrée dans ces différentes études, réside dans le faible nombre de patients étudiés. D'où la nécessité pour les études ultérieures, d'un plus grand nombre de sujets avant d'établir un éventuel lien entre polymorphisme du CYP2E1 et lésion hépatique. De plus, la cirrhose est une caractéristique spécifique de la maladie hépatique induite par l'alcool et plusieurs facteurs peuvent être liés à son développement. Par conséquent, il est nécessaire d'analyser un grand nombre de sujets pour inclure d'autres types de syndromes hépatiques induits par l'alcool et des sujets alcooliques sans syndrome hépatique, afin d'obtenir des conclusions claires.

De plus, des études sur les facteurs génétiques, contribuant à la pathogénicité du syndrome alcoolique hépatique, devraient être réalisées auprès d'un même groupe de patients afin d'évaluer la contribution relative de ces différents facteurs par rapport à l'ensemble du problème.

BIBLIOGRAPHIE

1. GEORGE J., LIDDLE C., MURRAY M., BYTH K., FARELL G.C.

Pre-translational regulation of cytochrome P450 genes is responsible for disease-specific changes of individual P450 enzymes among patients with cirrhosis.

Biochem Pharmacol, 1995, 49, 7, 873-881.

2. HAKKOLA J., PASANEN M., PURKUNEN R., SAARIKOSKI S., PELKONEN O., MAENPAA J., RANE A., RAUNIO H.

Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human adult and fetal liver.

Biochem Pharmacol, 1994, 48, 1, 59-64.

3. TASSANEYAKUL W., VERONESE M.E., BIRKETT D.J., GONZALEZ F.J., MINERS J.O.

Validation of 4-nitrophenol as an *in vitro* substrate probe for human liver CYP2E1 using cDNA expression and microsomal kinetic techniques.

Biochem Pharmacol, 1993, 46, 11, 1975-1981.

4. LYTTON S.D., HELANDER A., ZHANG-GOUILLON Z.Q., STOKKELAND K., BORDONE R., ARICO S., ALBANO E., FRENCH S.W., INGELMAN-SUNDBERG M.

Autoantibodies against cytochromes P-4502E1 and P-4503A in alcoholics.

Mol Pharmacol, 1999, 55, 2, 223-233.

5. LUCAS D., MENEZ C., GIRRE C., BERTHOU F., BODENEZ P., JOANNET I., HISPARD E., BARDOU L.G., MENEZ J.F.

Cytochrome P4502E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasians subjects.

Pharmacogenetics, 1995, 5, 5, 298-304.

6. YU M.W., GLADEK-YARBOROUGH A., CHIAMPRASERT S., SANTELLA R.M., LIAW Y.F., CHEN C.J.

Cytochrome P4502E1 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma.

Gastroenterology, 1995, 109, 4, 1266-1273 .

7. RAUCY J.L., CURLEY G., CARPENTER S.P.

Use of lymphocytes for assessing ethanol-mediated alterations in the expression of hepatic cytochrome P4502E1.

Alcohol Clin Exp Res, 1995, 19, 1369-1375.

8. GUENGERICH F.P., KIM D.H., IWASAKI M.

Role of human cytochrome P-4502E1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects.

Chem Res Toxicol, 1991, 4, 2, 168-179.

9. YAMAUCHI M., MAEZAWA Y., MIZUHARA Y., OHATA M., HIRAKAWA J., NAKAJIMA H., TODA G.

Polymorphisms in alcohol metabolizing enzyme genes and alcoholic cirrhosis in Japanese patients : a multivariate analysis.

Hepatology, 1995, 22 (4 Pt 1) :1136-1142.

10. SUZUKI D.T., GRIFFITHS A.J.F., MILLER J.H., LEWONTIN R.C.

Introduction à l'analyse génétique.- 4e ed.

Bruxelles : De Boeck, 1991. – 760p.

11. POWELL H., KITTERINGHAM N.R., PIRMOMHAMED M., PARK B.K., PARK S.

Expression of cytochrome P4502E1 in human liver : assessment by mRNA, genotype and phenotype.

Pharmacogenetics, 1998, 8, 411-421.

12. AMET Y., BERTHOU F., FOURNIER G., DREANO Y., BARDOU L., CLEDES J., MENEZ J.F.

Cytochrome P450 4A and 2E1 expression in human kidney microsomes.

Biochem Pharmacol, 1997, 53, 765-771.

13. CARRIERE V., BERTHOU F., BAIRD S., BELLOC C., BEAUNE P., DE WAZIERS I.

Human cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) : from genotype to phenotype.

Pharmacogenetics, 1996, 6, 3, 203-211.

14. CARPENTER S.P., LASKER J.M., RAUCY J.L.

Expression, induction, and catalytic activity of the ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) in human fetal liver and hepatocytes.

Mol Pharmacol, 1996, 49, 2, 260-268.

15. LECHEVREL M., CASSON A.G., WOLF C.R., HARDIE L.J., FLINTERMAN M.B., MONTESANO R., WILD C.P.

Characterization of cytochrome P450 expression in human oesophageal mucosa.

Carcinogenesis, 1999, 20, 2, 243-248. Résumé

16. HUKKANEN J., MANTYLA M., KANGAS L., WIRTA P., HAKKOLA J., PAAKI P., EVISALMI S., PELKONEN O., RAUNIO H.

Expression of cytochrome P450 genes encoding enzymes active in the metabolism of tamoxifen in human uterine endometrium.

Pharmacol Toxicol, 1998, 82, 2, 93-97. Résumé.

17. HUTSON J.L., WICKRAMASINGHE S.N.

Expression of CYP2E1 by human monocyte-derived macrophages.

J Pathol, 1999, 188, 2, 197-200. Résumé.

18. SCOBIE A.E., MASON H.J.

Measurement of immunoreactive cytochrome P4502E1 in human leucocytes.
Biomarkers, 1999, 4, 4, 311-317.

19. Mc CARVER D.G., BYUN R., HINES R.N., HICHME M., WEGENEK W.

A genetic polymorphism in the regulatory sequences of human CYP2E1 : association with increased chlorzoxazone hydroxylation in the presence of obesity and ethanol intake.
Toxicol Appl Pharmacol, 1998, 152, 1, 276-281.

20. RAUCY J.L.

Risk assessment toxicity from chemical exposure resulting from enhanced expression of CYP2E1.
Toxicology, 1995, 105, 217-223.

21. DELON A.

Induction enzymatique hépatique du cytochrome P450. Application à l'étude des interactions : rifampicine/ prednisone et phénobarbital/ ciclosporine.
Thèse : Pharm : Poitiers :1992 ; 31-35.

22. MAYER H.A.

Induction enzymatique : description et évaluation. Place du 6 beta-hydroxycortisol.
Thèse : Pharm : Nancy : 1985; 23-49.

23. RAUCY J.L., KRANER J.C., LASKER J.M.

Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1.
Critical reviews in toxicology, 1993, 23,1, 1-20.

24. GROVE J., ST J.M. BROWN A., DALY A.K., BASSENDINE M.F., JAMES O.F.W., DAY C.P.

The RsaI polymorphism of CYP2E1 and susceptibility to alcoholic liver disease in Caucasians : effect on age of presentation and dependence on alcohol dehydrogenase genotype.

Pharmacogenetics, 1998, 8, 4, 335-342.

25. LIEBER C.S.

Cytochrome P-4502E1 : its physiological and pathological role.

Physiol Rev, 1997, 77, 2, 517-544.

26. DILGER K., METZLER J., BODE J.C., KLOTZ U.

CYP2E1 activity in patients with alcoholic liver disease.

J Hepatol, 1997, 27, 6, 1009-1014.

27. LADERO J.M., AGUNDEZ J.A.G., RODRIGUEZ-LESCURE A., DIAZ-RUBIO M., BENITEZ J.

RsaI polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus and risk of hepatocellular carcinoma.

Gut, 1996, 39, 330-333.

28. COURT M.H., VON MOLTKE L.L., SHADER R.I., GREENBLATT D.J.

Biotransformation of chlorzoxazone by hepatic microsomes from humans and ten other mammalian species.

Bio Drug Dispos, 1997, 18, 3, 213-226.

29. SIMI A., INGELMAN-SUNDBERG M.

Post-translational inhibition of cytochrome P-450 2E1 expression by chlomethiazole in Fao hepatoma cells.

J Pharmacol Exp Ther, 1999, 289, 2, 847-852. Résumé.

30. GEBHARDT A.C., LUCAS D., MENEZ J.F., SEITZ H.K.

Chlomethiazole inhibition of cytochrome P450 2E1 as assessed by chlorzoxazone hydroxylation in humans.

Hepatology, 1997, 26, 4 : 957-961. Résumé.

31. O'SHEA D., KIM R.B., WILKINSON G.R.

Modulation of CYP2E1 activity by isoniazid in rapid and slow *N*-acetylators.

J Clin Pharmacol, 1997, 43, 99-103.

32. ZAND R., NELSON S.D., SLATERRY J.T., THUMMEL K.E., KALHORN T.F., ADAMS S.P., WRIGHT J.M.

Inhibition and induction of cytochrome P4502E1-catalysed oxidation by isoniazid in humans.

Clin Pharmacol Ther, 1993, 54, 142-149.

33. PIRMOHAMED M., KITTERINGHAM N.R., QUEST L.J., ALLOTT R.L., GREEN V.J., GILMORE I.T., PARK B.K.

Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians.

Pharmacogenetics, 1995, 5, 6, 351-357.

34. CARR L.G., HARTLEROAD J.Y., MENDENHALL C., MORITZ T., THOMASSON H.

Polymorphism at the P450IIE1 locus is not associated with alcoholic liver disease in Caucasian men.

Alcohol Clin Exp Res, 1995, 19, 1, 182-184.

35. KOOP D.R.

Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P4502E1.

Faseb J, 1992, 6, 2, 724-730.

36. FRYE R.F., ADEDOYIN A., MAURO K., MATZKE G.R., BRANCH R.A.

Use of chlorzoxazone as an in vivo probe of cytochrome P450 2E1: choice of dose and phenotypic trait measure.

J Clin Pharmacol, 1998, 38, 1, 82-89.

37. LUCAS D., MENEZ J.F., BERTHOU F.

Chlorzoxazone an in vitro and in vivo substrate probe for liver CYP2E1.

Methods in enzymology, 1997, 272, 115-123.

38. LABORATOIRES PFIZER

Précis de poche de pharmacocinétique

Paris : Pfizer, 1993, 127 p.

39. SAVOLAINEN V.T., PAJARINEN J., PEROLA M., PENTILLA A., KARHUNEN P.J.

Polymorphism in the cytochrome P450 2E1 gene and the risk of alcoholic liver disease.

J Hepatol, 1997, 26, 1, 55-61.

40. VESELL E.S., De ANGELO SEATON T., A-RAHIM Y.I.

Studies on interindividual variations of CYP2E1 using chlorzoxazone as an in vivo probe.

Pharmacogenetics, 1995, 5, 53-57.

41. DUPONT I., BODENEZ P., BERTHOU F., SIMON B., BARDOU L.G., LUCAS D.

Cytochrome P4502E1 activity and oxidative stress in alcoholic patients.

Alcohol Alcohol, 2000, 35, 1, 98-103.

42. GEORGE J., BYTH K., FARRELL G.C.

Age but not gender selectively affects expression of individual cytochrome P450 proteins in human liver.

Biochem Pharmacol, 1995, 50, 5, 727-730.

43. KALL M.A., VANG O., CLAUSEN J.

Effects of dietary broccoli on human in vivo drug metabolizing enzymes : evaluation of caffeine, oestrone and chlorzoxazone metabolism.

Carcinogenesis, 1996, 17, 793-799.

44. O'SHEA D., DAVIS S.N., KIM R.B., WILKINSON G.R.

Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone : a putative probe of CYP2E1 activity.

Clin Pharmacol Ther, 1994, 56, 359-367.

45. LECLERCQ I., HORSMANS Y., DESAGER J.P., PAUWELS S., GEUBEL A.P.

Dietary restriction of energy and sugar results in a reduction in human cytochrome P450 2E1 activity.

Br J Nutr, 1999, 82, 257-262.

46. SONG B.J., VEECH R.L., SAENGER P.

Cytochrome P450IIE1 is elevated in lymphocytes from poorly controlled insulin-dependent diabetics.

J Clin Endocrinol Metab, 1990, 71, 1036-1040.

47. KOTLYAR M., CARSON S.W.

Effects of obesity on the cytochrome P450 enzyme system.

Int J Clin Pharmacol Ther, 1999, 37, 1, 8-19.

48. ITOGA S., NOMURA F., HARADA S., TSUTSUMI M., TAKASE S., NAKAI T.

Mutations in the exons and exon-intron junction regions of human cytochrome P-4502E1 gene and alcoholism.

Alcohol Clin Exp Res, 1999, 23 (4 Suppl) :13S-16S.

49. FAIRBROTHER K.S., GROVE J., DE WAZIERS I., STEIMEL D.T., DAY C.P., CRESPI C.L., DALY A.K.

Detection and characterization of novel polymorphisms in the CYP2E1 gene.

Pharmacogenetics, 1998, 8, 543-552.

50. LUCAS D., FERRARA R., GONZALEZ E., BODENEZ P., ALBORES A., MANNO M., BERTHOU F.

Chlorzoxazone, a selective probe for phenotyping CYP2E1 in humans.

Pharmacogenetics, 1999, 9, 377-388.

51. HU Y., OSCARSON M., JOHANSSON I., YUE Q.Y., DAHL M.L., TABONE M., ARINCO S., ALBANO E., INGELMAN-SUNDBERG M.

Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles.

Mol Pharmacol, 1997, 51, 3, 370-376.

52. LE MARCHAND L., WILKINSON G.R., WILKENS L.R.

Genetic and dietary predictors of CYP2E1 activity : a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1999, 8, 6, 495-500.

53. CHAO Y.C., YOUNG T.H., CHANG W.K., TANG H.S., HSU C.T.

An investigation of whether polymorphisms of cytochrome P4502E1 are genetic markers of susceptibility to alcoholic end-stage organ damage in a Chinese population.

Hepatology, 1995, 22, 5, 1409-1414.

54. PARK K.S., SOHN D.H., VEECH R.L., SONG B.J.

Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid.

Eur J Pharmacol, 1993, 248, 7-14.

55. KHARASCH E.D., THUMMEL K.E., MHYRE J., LILLIBRIDGE J.H.

Single-dose disulfiram inhibition of chlorzoxazone metabolism : a clinical probe for P450 2E1.

Clin Pharmacol Ther, 1993, 53, 6, 643-650.

56. IWAHASHI K., MATSUO Y., SUWAKI H., NAKAMURA K., ICHIKAWA Y.

CYP2E1 and ALDH2 genotypes and alcohol dependence in Japanese.

Alcohol Clin Exp Res, 1995, 19, 564-566.

57. TSUTSUMI M., WANG J.S., TAKASE S., TAKADA A.

Hepatic messenger RNA contents of cytochrome P4502E1 in patients with different P4502E1 genotypes.

Alcohol Alcohol, 1994, 29 Suppl 1 : 29-32.



DEMANDE D'IMPRIMATUR

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par

RACHIDA ELOUARDISujet :Polymorphisme génétique du CYP2E1 et
susceptibilité à l'alcoolJury :

Président : Melle M.M GALTEAU, Professeur

Juges : Mme S. FOURNEL-GIGLEUX, Directeur de
Recherche INSERM
Mme G. HUBSCH, Pharmacien d'officine

Vu,

NANCY, le 10 novembre 2000

Le Président de thèse.

Melle le Professeur M.M. GALTEAU



Vu et approuvé,

Vu,

NANCY, le

Le Doyen de la faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré – NANCY I,

Chantal FINANCE

NANCY, le 27 novembre 2000

n° 933

Le Président de l'Université
Henri Poincaré – NANCY I

N° d' identification 74N/2000/007

**POLYMORPHISME GENETIQUE DU CYTOCHROME P450 2E1
ET
SUSCEPTIBILITE A L'ALCOOL**

Thèse soutenue le 12 décembre 2000

Par Rachida ELOUARDI

RESUME :

Chez l'homme, l'éthanol est métabolisé par différents systèmes enzymatiques parmi lesquels le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) joue un rôle primordial. Cette enzyme hépatique est capable de métaboliser des composés comme l'acétone formée au cours du diabète ou du jeûne prolongé, des solvants industriels (benzène), des toxiques (nitrosamines) et des médicaments (paracétamol, halothane, isoniazide).

La chlorzoxazone, substance utilisée en thérapeutique comme décontracturant musculaire, est spécifiquement métabolisée en 6-hydroxychlorzoxazone par le CYP2E1 et permet de mesurer l'activité de cette enzyme. L'activité du CYP2E1 est par ailleurs régulée par différents états hormonaux et nutritionnels.

Une consommation chronique d'alcool induit le CYP2E1. Il existe des différences de susceptibilité à développer une cirrhose hépatique consécutive à un abus chronique d'alcool, et le polymorphisme génétique du CYP2E1 pourrait en être la cause.

Plusieurs polymorphismes génétiques ont été observés sur le gène du CYP2E1 et de nombreuses études ont été réalisées afin de savoir si les différences de génotype de cette enzyme peuvent expliquer les différences de susceptibilité à l'alcool. Les résultats de ces études se sont avérés contradictoires, et il est difficile d'établir une association entre polymorphisme génétique du CYP2E1 et susceptibilité à l'alcool.

MOTS CLES: CYP2E1- GENETIQUE - SUSCEPTIBILITE - ALCOOL

Directeur de Thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
M.M.GALTEAU Professeur de biochimie	Centre du médicament	Expérimentale Bibliographique Thème X 3

- Thèmes 1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 – Biologie 2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle