

Les cytochromes P-450 hépatiques humains

Les cytochromes P-450 représentent plusieurs familles d'isoenzymes codées par des gènes différents, qui jouent un rôle déterminant dans la détoxification des xénobiotiques. Parfois, cependant, ils catalysent la formation d'un métabolite toxique pour le foie.

Philippe H. Beaune

Chef de travaux assistant des Universités. Pharmacien, Docteur ès-sciences

L'homme dans son environnement est de plus en plus agressé par des substances étrangères : les xénobiotiques (médicaments, polluants, fumée de cigarettes, etc.). La plupart de ces xénobiotiques sont hydrophobes et donc difficiles à éliminer par l'organisme. Il s'est développé, au cours de l'évolution, un système de défense contre ces xénobiotiques, qui devait répondre à deux critères : d'abord être aspécifique, donc capable de métaboliser des substances de nature chimique variée et imprévisible; ensuite, pouvoir transformer des produits hydrophobes en métabolites hydrophiles, plus faciles à éliminer dans l'urine et dans la bile. Ce système peut être schématisé comme cela est indiqué dans la *figure 1*. La phase I, qui consiste à introduire une fonction chimique, est très fréquemment une réaction d'oxydation catalysée par le cytochrome P-450. La phase II de « conjugaison » consiste à rajouter un radical, comme l'acide glucuronique, pour augmenter

encore l'hydrophilie de la molécule. Nous nous concentrerons ici sur le cytochrome P-450 microsomal hépatique. Le foie est en effet le principal lieu de détoxification (toutefois, la présence du cytochrome P-450 a été démontrée dans presque tous les tissus).

Le cytochrome P-450 est une hémoprotéine

Le fer de l'hème, lié à une cystéine, peut fixer de l'oxygène (O₂) ou de l'oxyde de carbone (CO), comme l'hémoglobine. C'est un atome de cet oxygène qui, après activation, sera introduit dans le substrat au cours de la réaction de monooxygénation. Le cytochrome P-450 comporte d'autre part une zone hydrophobe qui lui permet de fixer et de positionner les substrats (*figure 2*). Il catalyse principalement des réactions de monooxygénation schématisées dans les *figures 1 et 3* (phase I). Le substrat RH peut se fixer sur la zone hydrophobe du cytochrome P-450,

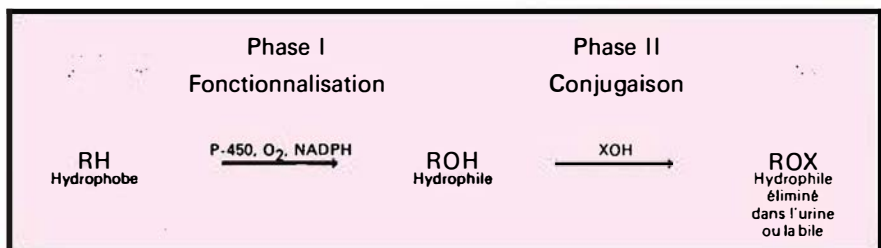


Figure 1. *Schéma général du métabolisme des xénobiotiques.* R = Radical hydrophobe, par exemple hydrocarbure. X = Radical hydrophile, par exemple acide glucuronique.

ADRESSE

Inserm U75, 156, rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15.
Adresse actuelle : Center in Molecular Toxicology, School of Medicine, Vanderbilt University, Nashville, TN 37232 USA.

figure 3 (1 et 2), qui après réduction, figure 3 (3) est prêt à fixer une molécule d'oxygène, figure 3 (4). Après réduction par un deuxième électron, l'oxygène se trouve sous une forme activée, figure 3 (5), capable de réagir avec la plupart des composés hydrophobes qui sont souvent peu réactifs [1]. Globalement, cette réaction nécessite deux protons et deux électrons qui sont apportés par le NADPH/H⁺ et transférés au cytochrome P-450 par une ou deux flavoprotéines (des « réductases »). Le cytochrome P-450 peut également catalyser d'autres réactions : réduction, lorsque le milieu est pauvre en oxygène ou oxydation ne faisant pas intervenir directement l'oxygène sur le substrat (par exemple l'oxydation de la nifédipine).

Plusieurs isoenzymes du cytochrome P-450

Pour expliquer la très faible spécificité de substrat du cytochrome P-450, deux théories se sont longtemps opposées : la première selon laquelle il existerait un seul isoenzyme totalement aspécifique; la seconde selon laquelle il existerait une multitude d'isoenzymes à spécificité très étroite, à la limite chaque substrat serait métabolisé par un seul isoenzyme. Selon cette seconde hypothèse, ce système de défense ressemblerait au système immunitaire.

En fait, la réalité se situe entre ces deux hypothèses extrêmes [2]. Il existe un nombre limité d'isoenzymes dont la spécificité est étroite, sans être absolue. Ainsi a-t-on pu isoler chez les animaux de laboratoire une vingtaine d'isoenzymes. Chez l'homme, le nombre connu est plus limité (tableau I, p. suivante) [3]. Chaque isoenzyme métabolise efficacement un nombre limité de substrats de structure spatiale généralement proche. Pour chaque isoenzyme, il existe des variants.

Des enzymes membranaires

Les cytochromes P-450 se trouvent soit dans le réticulum endoplasmique

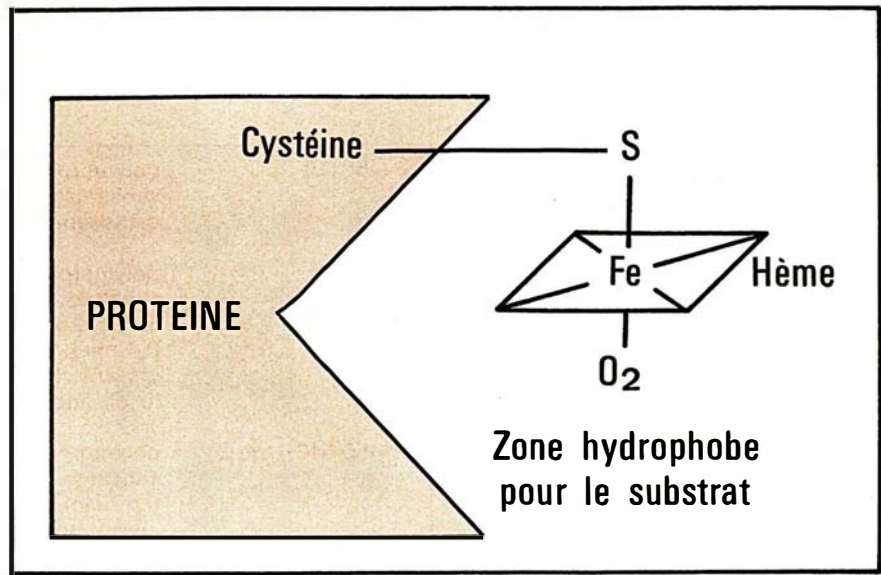


Figure 2. Représentation schématique du cytochrome P-450.

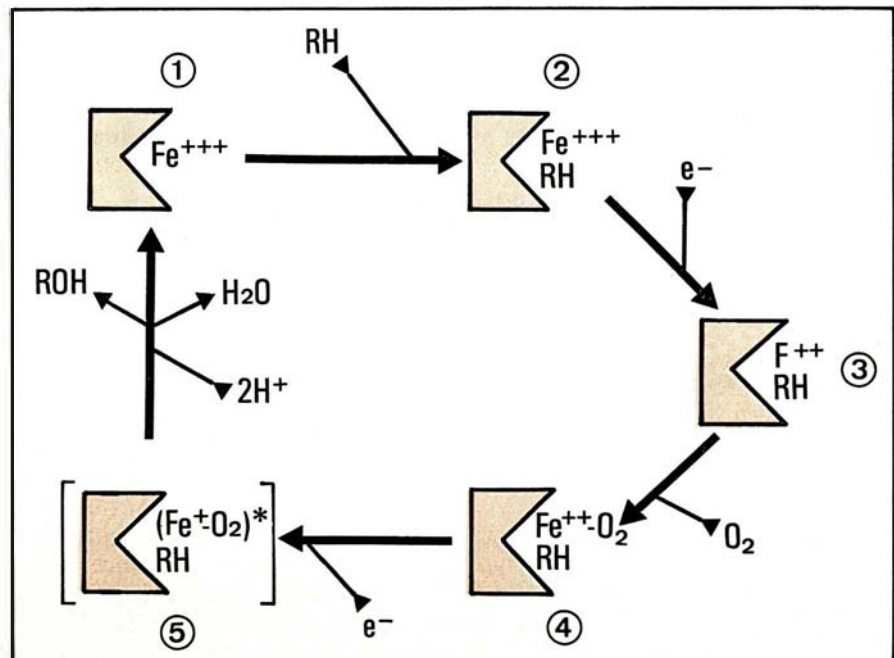


Figure 3. Cycle catalytique du cytochrome P-450. Ce cycle est une simplification permettant de voir les différentes étapes de la réaction de monoxygénation. La schématisation utilisée est celle de la figure 2. La forme 5 recouvre en fait plusieurs étapes au cours desquelles l'oxygène est activé (ce qui est indiqué par l'astérisque) et un atome réagit avec le substrat, tandis que l'autre se lie à deux protons pour former de l'eau. La forme 3 peut se lier à du CO (monoxyde de carbone) de façon stable et le cytochrome P-450 absorbe alors à 450 nm : c'est l'origine du nom de cet enzyme.

Tableau I
CYTOCHROMES P-450 HÉPATIQUES HUMAINS

P-450 DB	polymorphisme substrats : débrisoquine, bufuralol, spartéine, etc. cet isoenzyme existe en faible quantité
P-450NF	polymorphisme substrats : nifédipine, benzphétamine, cortisol (6 β), testostérone (6 β) 0,4 nmol/mg protéines présent chez le fœtus localisation centrolobulaire
P-450 MP 1 ou 2	polymorphisme substrats : méphénytoïne, benzopyrène 0,6 nmol/mg protéines absent chez le fœtus localisation centro et périlobulaire
P-450 PA	polymorphisme substrat : phénacétine
P-450 9	substrats : ? 0,1 nmol/mg protéines présent chez le fœtus
P1 et P3-450	connus seulement par leur ADNc
P-450 PB	connu seulement par son ADNc sans doute inductible par le phénobarbital

RÉFÉRENCES

- Guengerich FP, McDonald TL. Chemical mechanism of catalysis by cytochrome P-450: an unified view. *Acc Chem Res* 1984; 17: 9-16.
- Numéro spécial sur les cytochromes P-450. *Xenobiotica* 1982; 12: 673-802.
- Guengerich FP, ed. Mammalian cytochromes P-450. Boca Raton: CRC Press, 1986 (sous presse).
- Bresnick E, Foldes R, Hines RN. Induction of cytochrome P-450 by xenobiotics. *Pharmacol Rev* 1984; 36: 435-505.
- Adesnick M, Atchinson M. Genes for cytochromes P-450 and their regulation. *CRC Crit Rev Biochem* 1986; 19: 247-306.
- Whitlock JP Jr. The regulation of cytochrome P-450 gene expression. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1986; 26: 333-70.
- Nebert DW. P-450 genes and their regulation. *Trends Pharmacol Sci* 1985; 8: 270-3.
- Guengerich FP, Beaune PH, Churchill FP. Molecular biology of cytochrome P-450. *Hepatology* 1986 (sous presse).
- Symposium on polymorphism of drug oxydation: *Fed Proc* 1984; 43: 2295-345.
- Ayesh R, Idle JR, Ritchie JC, et al. Metabolic oxydation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature* 1984; 312: 169-70.

que (microsomes après fractionnement subcellulaire), soit dans les mitochondries; ceux qui nous intéressent ici sont dans la fraction microsomale, associés d'une part à des réductases qui transfèrent les électrons, et d'autre part aux lipides membranaires.

Certains P-450 sont inductibles

L'administration de certaines substances, comme le phénobarbital, augmente la concentration du cytochrome microsomal hépatique. De nombreuses autres substances sont inductrices et quelques exemples en sont donnés dans le *tableau II* [4].

Les facteurs faisant varier la concentration et l'activité des cytochromes P-450 vont être énumérés ci-après.

Induction/répression

La connaissance détaillée des isoenzymes du cytochrome P-450 chez

les animaux de laboratoire a permis de mettre en évidence plusieurs points : l'administration de composés inducteurs augmente réellement la quantité de protéines en agissant sur la synthèse d'ARNm [4-7]. Pour le 3-méthyl-cholantrène ou les composés assimilés comme la dioxine, le mécanisme est maintenant bien connu chez la souris [5, 6, 7], mais moins bien chez l'homme [4-7] : l'inducteur se lie à un récepteur qui va activer une séquence d'ADN permettant la transcription d'un ou plusieurs gènes codant pour le(s) cytochrome(s) P-450 (*figure 4, p. 362*). Ce schéma est très général, mais la réalité de la plupart des étapes a été démontrée expérimentalement, parfois chez l'homme. Les progrès récents de la génétique moléculaire ont même permis de démontrer, chez la souris, qu'il existait également une régulation négative qui, dans des conditions basales, inhibait l'expression de cette famille de cytochrome P-450 (*figure 4*), [6, 8]. L'intervention d'un récepteur, comme pour l'in-

duction par le 3-méthyl-cholantrène ou la dioxine, n'a pu être mise en évidence pour d'autres inducteurs comme le phénobarbital, ou les glucocorticoïdes. La plupart des inducteurs augmentent la synthèse d'une famille d'isoenzymes en étant souvent plus spécifique de l'un d'entre eux. Ces isoenzymes de la même famille ont une grande similitude de séquences d'acides aminés. L'induction de certains isoenzymes s'accompagne généralement de la répression des isoenzymes constitutifs. Cela a été observé lors de l'induction par le phénobarbital et par le 3-méthyl-cholantrène. En résumé, les inducteurs font varier le profil isoenzymatique des cytochromes P-450 et modifient ainsi la capacité de métabolisation du foie. L'induction n'est pas un phénomène uniquement hépatique; elle a été démontrée dans les poumons ou les reins, par exemple.

Inhibition

Certaines substances, dont des médicaments, sont inhibitrices des cytochromes P-450. Elles peuvent agir par plusieurs mécanismes. Le premier est une simple compétition de substrats (médicaments) pour le même isoenzyme. In vivo, ce phénomène semble peu important. Le

second est une fixation sur l'hème qui inhibe d'une façon non spécifique tous les cytochromes P-450; c'est ce mécanisme qui est impliqué dans l'inhibition, bien documentée, par la cimétidine et d'autres composés comportant des imidazoles (kétoconazole). Le troisième est une fixation covalente, après métabolisation, sur l'hème ou sur le site actif, de la protéine détruisant et/ou inactivant le P-450. Un des exemples les plus récents est la troléandomycine (TAO).

Développement

Le métabolisme des médicaments se modifie constamment au cours de la vie; cela est dû, entre autres, aux variations qualitatives et quantitatives des cytochromes P-450. C'est particulièrement net chez le fœtus humain, dont certaines activités monooxygénasiques sont assez proches de celles de l'adulte (benzphétamine - N - déméthylase, par exemple) et d'autres pratiquement inexistantes (benzopyrène hydroxylase). Il a été montré que le profil isoenzymatique des cytochromes P-450 variait considérablement : certains isoenzymes sont absents chez le fœtus (cytochrome P-450 MP) et d'autres sont présents à des taux proportionnels à ceux de l'adulte (P-450 NF) [3-7]. Chez l'adulte très âgé, le métabolisme des médicaments est perturbé. Cela paraît principalement dû à des modifications de flux sanguin ou d'absorption, plutôt qu'à des modifications des cytochromes P-450. Cependant, il a été clairement montré, aussi bien chez l'homme que chez l'animal de laboratoire, que l'inductibilité des enzymes du métabolisme des médicaments était fortement diminuée chez les sujets très âgés.

Nutrition

Des facteurs nutritionnels peuvent avoir une influence directe sur les cytochromes P-450. De façon générale, le jeûne ou un régime riche en glucides et pauvre en protéines, diminue les monooxygénases hépatiques. Par contre, les lipides ne semblent pas influencer nettement

ces activités. L'effet des vitamines est complexe et peu clair. Certains produits naturels agissent sur les cytochromes P-450 : ainsi les indoles rencontrés dans les choux sont inducteurs; certains flavonoïdes sont activateurs; la caféine et la théobromine peuvent être inducteurs. Le principal agent nutritionnel dont les effets sont assez bien connus est l'éthanol. Au cours d'une ingestion aiguë, il est inhibiteur tandis que lors d'ingestion chronique il est inducteur d'un isoenzyme du cytochrome P-450 qui est aussi vraisemblablement inductible, au moins chez l'animal, par l'isoniazide et l'imidazole. Enfin, il faut noter que les aliments grillés sur des feux de bois ou de charbon de bois, par exemple, fixent des hydrocarbures aromatiques cancérigènes et inducteurs qui modifient la vitesse de métabolisation des médicaments.

Pathologie

Certains états pathologiques ont une influence notable sur les activités monooxygénasiques hépatiques et les cytochromes P-450 dont la concentration décroît au cours des hépatites ou des cirrhoses. Le diabète modifie également les activités monooxygénases hépatiques; certaines sont augmentées, d'autres sont inchangées.

Polymorphisme génétique

A côté de ces facteurs liés à l'environnement, des facteurs génétiques influencent l'expression des cytochromes P-450. En 1977, il a été mis en évidence un polymorphisme génétique qui peut être défini ainsi [9] : un faible pourcentage de différentes populations métabolise lentement un substrat, ici la débrisoquine, ou certains autres médicaments comme le bufuralol. On a montré que ce trouble était d'origine génétique et était dû à un déficit en un isoenzyme du cytochrome P-450 (P-450 DB) qui a été purifié. Depuis, d'autres polymorphismes ont été décrits et étudiés en détail, tels ceux intéressant le métabolisme de la méphénytoïne (P-450 MP 1 et 2), de la phénacétine

Tableau II
QUELQUES EXEMPLES
D'INDUCTEURS

médicaments

phénobarbital
rifampicine
dexaméthasone

aliments et additifs

éthanol
isosafrole
caféine (faible)
flavones

polluants

benzène
DDT
hydrocarbures aromatiques
(cigarette)
dioxine

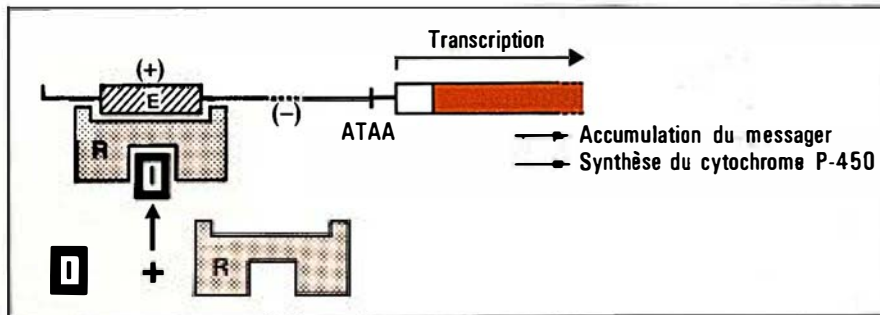


Figure 4. **Schéma de l'induction par les hydrocarbures aromatiques polycycliques.** L'inducteur se lie au récepteur et forme une association qui peut activer la transcription de l'ADN en ARNm (+). Celui-ci pourra être traduit en cytochrome P-450 (en fait au moins deux isoenzymes sont induits). Il existe également une régulation négative (-), encore mal connue, mais qui réprimerait l'expression de ces isoenzymes à l'état basal par l'intermédiaire d'une protéine. Ce modèle correspond à deux schémas classiques : l'induction par activation de la transcription et le récepteur des stéroïdes. Cependant, la plupart des étapes ont été démontrées chez la souris et/ou l'homme [6]. E = « enhancer » conditionnel, stimulé par l'hydrocarbure; I = hydrocarbure inducteur; R = Récepteur protéique de l'hydrocarbure; rectangle blanc : exon, partie non codante; rectangle rouge : exon, partie codante.

(P-450 PA) et, plus récemment, de la nifédipine (P-450 NF). Pour chacun de ces déficits, un isoenzyme de P-450 a été mis en cause. En revanche, le mécanisme du déficit reste inconnu dans le cas d'autres polymorphismes, tel celui impliqué dans le métabolisme de la tolbutamide. La conséquence de ces polymorphismes est que chaque individu métabolise les différents xénobiotiques, et donc les différents médicaments, à des vitesses différentes. En fonction de l'activité et de la toxicité des substances ingérées et de leurs métabolites, chaque individu aura donc une réponse pharmacotoxicologique qui dépendra, au moins en partie, de l'activité de l'un ou de plusieurs des isoenzymes du P-450 contrôlant la vitesse de métabolisation du xénobiotique.

Génétique moléculaire

Malgré l'intérêt de bien connaître la régulation des cytochromes P-450, les outils de la génétique moléculaire ont été utilisés tardivement dans ce domaine, sans doute à cause de la difficulté à purifier les différents isoenzymes du cytochrome P-450. Chez les animaux de laboratoire, de nombreux gènes ont été clonés : l'obtention de sondes d'ADNc a permis de mieux connaître l'organisation du génome et la

régulation de ces isoenzymes [5, 6, 8]. Ainsi, il existe plusieurs familles de cytochromes P-450 dont les membres ont une large similitude de séquence en acides aminés [5] : par exemple, la famille inducible par le phénobarbital, celle induite par les hydrocarbures aromatiques, celle induite par la prégénolone-16 α -carbonitrile.

Chacune de ces familles est multigénique, et est localisée sur des chromosomes différents, alors que les gènes d'une même famille sont situés sur un même chromosome [8]. De plus, certains mécanismes de régulation ont été bien mis en évidence, comme celui de la famille inducible par les hydrocarbures aromatiques [6] (figure 4). Aucun récepteur n'a pu être mis en évidence pour les autres familles de cytochrome P-450. Par contre, il a été montré que dans la plupart des cas, l'induction provoquait l'augmentation de la transcription d'un ou plusieurs ARNm spécifiques. Chez l'homme, peu de choses sont connues mais les progrès récents ont été rapides; plusieurs ADNc ont été isolés, par exemple ceux codant pour les cytochromes P-450 PB similaires à l'isoenzyme majoritaire induit par le phénobarbital, P 1 et P 3-450 similaires aux P-450 de rats, de souris et de lapins induits par les hydrocarbures aromatiques. Plus

récemment encore, certains ADNc provenant des isoenzymes impliqués dans le polymorphisme des P-450 ont été isolés. Ainsi celui du P-450 MP (méphénytoïne : Umbenhauer et Guengerich, communication personnelle) et celui du P-450 NF (nifédipine : Beaune *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1986. Sous presse). Ces outils de la génétique moléculaire associés à d'autres, comme la culture tissulaire, les anticorps monoclonaux, l'immunoquantification, vont enfin permettre d'étudier chez l'homme le rôle et la régulation des différents isoenzymes du cytochrome P-450, dont à l'heure actuelle on ne connaît pas grand chose. Enfin, les sondes d'ADN permettront d'étudier le polymorphisme génétique et d'établir facilement et de façon sûre le phénotype des individus.

Implications cliniques

Chaque xénobiotique ou médicament et leurs métabolites ont des propriétés pharmacologiques et toxicologiques différentes. Les cytochromes P-450 sont des enzymes-clés de ce métabolisme et, de ce fait, la connaissance de leur profil isoenzymatique et de ses modifications est d'une grande importance pour la prévision et/ou la modulation des effets pharmacotoxicologiques. Nous en verrons brièvement quelques exemples et nous passerons rapidement en revue les moyens d'évaluation, in vivo, des isoenzymes du cytochrome P-450.

Les interactions médicamenteuses

L'induction : les effets du phénobarbital sur le métabolisme de la warfarine et d'autres médicaments sont connus depuis longtemps. D'autres inducteurs et d'autres interactions ont été décrits depuis (l'induction par la rifampicine et son effet sur les contraceptifs oraux ou, plus récemment, sur le métabolisme de la cyclosporine). Généralement, l'effet en est une diminution de l'efficacité thérapeutique mais il peut être aussi une modification ou une augmentation, si le métabolite

est plus actif ou possède une activité pharmacologique différente.

L'inhibition : certains médicaments sont inhibiteurs et bloquent le cytochrome P-450. Cela explique certaines interactions observées par exemple avec la cimétidine, des antifongiques comme le kétoconazole, des antibiotiques comme le TAO. Dans chacun de ces cas, le résultat est une diminution du métabolisme entraînant généralement une augmentation des effets pharmacologiques, l'apparition d'effets non désirés et, parfois, des accidents de toxicité. Ainsi, l'accroissement de la toxicité rénale de la cyclosporine a été observé en cas de co-administration de cimétidine.

Facteurs génétiques

Comme décrit précédemment, certains isoenzymes du cytochrome P-450 sont inactifs dans un faible pourcentage de la population. Il peut y avoir plusieurs conséquences cliniques de ce déficit : soit le métabolite est moins actif et, dans ce cas, il y aura exagération de l'effet pharmacologique (hypotension due à la débrisoquine), soit le métabolite est plus actif et dans ce cas il y aura peu ou pas d'effet pharmacologique (cas de l'encainide). Dans certains cas, un produit toxique s'accumule (neuropathie due à la perhexiline). Enfin, le déficit en P-450DB a été associé à une prédisposition à certaines maladies : maladie de Parkinson, cancer [10]. Aucune relation de cause à effet n'a pu être mise en évidence, mais les corrélations présentées sont bien troublantes et les hypothèses simples et séduisantes : soit le déficit ne permet pas de détoxifier un composé toxique ou cancérogène (cas où les sujets déficients sont à haut risque), soit l'isoenzyme produit un composé plus toxique ou plus cancérogène (cas où les sujets non déficients sont à haut risque).

Anges ou démons

Les cytochromes P-450 ont pour but de rendre hydrophiles des composés hydrophobes qui sont généralement peu réactifs. Le cytochrome P-450 active l'oxygène pour qu'il

puisse réagir; les produits formés par cette réaction sont parfois très réactifs, comme des époxydes, et finalement plus toxiques que le composé initial. Ils peuvent se fixer aux macromolécules cellulaires et être responsables soit de nécrose cellulaire, soit de mutagenèse et/ou de cancérogenèse : on explique ainsi les hépatites toxiques dues au tétrachlorure de carbone ou à l'halotane et les cancers du foie attribués à l'aflatoxine B₁. Dans le cas de l'halotane, les hépatites très graves semblent dues à une réaction immunitaire contre un cytochrome P-450 modifié par un métabolite. Ce mécanisme a été invoqué pour d'autres médicaments. Finalement, les cytochromes P-450 sont un moyen de défense efficace et peu spécifique pour éliminer les xénobiotiques. Le prix à payer de cette efficacité est la production accidentelle de métabolites réactifs qui peuvent être toxiques, mutagènes et/ou cancérogènes. L'équilibre entre ces métabolites toxiques ou atoxiques dépend, au moins partiellement, du profil isoenzymatique des cytochromes P-450. Enfin, il existe d'autres lignes de défense qui peuvent à leur tour détoxifier ces métabolites réactifs. La toxicité ne se produit que lorsque tous ces systèmes de défense sont débordés.

Moyens d'étude in vivo

La connaissance du profil isoenzymatique et du taux de cytochrome P-450 in vivo serait utile à la compréhension, à la prévision et à la modulation de l'effet et de la toxicité des médicaments. Il existe à l'heure actuelle peu de tests in vivo pour évaluer les cytochromes P-450. Le dosage du 6- β -hydroxycortisol est une bonne indication du taux de P-450NF (Ged et Beaune, manuscrit en préparation). Les métabolites de l'antipyrine et de la caféine varient en fonction de l'induction, mais on ne connaît pas leur signification en terme d'isoenzymes de cytochrome P-450. En revanche, il est possible d'établir le phénotype pour le P-450DB, MP ou NF, et ceci sera encore facilité par l'utilisation des sondes d'ADNc.

En résumé, il existe à l'heure actuelle peu de tests pour évaluer les cytochromes P-450 hépatiques; cependant, nous disposons maintenant des outils biochimiques permettant de connaître la signification réelle de tests classiques (antipyrine, par exemple) et d'en mettre au point de nouveaux plus performants ■

Summary

Hepatic microsomal cytochromes P-450 play a central role in xenobiotic metabolism. Their concentration and their isoenzymatic pattern in the liver differ as a function of numerous environmental and/or genetic factors. This results in modifications of liver metabolic capacity of detoxication or of "toxication". Recent progress, particularly in molecular genetics, allows to better understand the mechanism of action, the modification and regulation of cytochrome P-450 isozymes. However, much remains to be done, mainly in the application of basic knowledge to clinical pharmacology and toxicology.

TIRÉS A PART

P. H. Beaune : Inserm U 75, 156, rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15.