

**ROLE DU METABOLISME DANS
L'HEPATOTOXICITE
DE LA CYCLOSPORINE A ET DE LA COCAINE:
Relation entre l'induction et l'inhibition
de leur métabolisme et leur cytotoxicité
sur un modèle de culture primaire
d'hépatocytes de rat.**

présentée à
L'ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE ZURICH
pour l'obtention du
titre de Docteur ès sciences naturelles
par
PATRICK BOUIS

RESUME

L'hépatotoxicité induite par la cocaïne (A) et la cyclosporine A (B) ainsi que le métabolisme de ces deux xénobiotiques ont été étudiés *in vitro*. Une étude préliminaire visant à caractériser le modèle expérimental a montré que les cultures primaires d'hépatocytes de rat conservaient à court terme un potentiel élevé de métabolisation (par les cytochromes P-450) et de protection cellulaire (par le glutathion, GSH). De plus, grâce à l'induction des cytochromes P-450 ou à l'inhibition de leurs activités enzymatiques et à l'emploi d'un inhibiteur spécifique de la biosynthèse du GSH (la buthionine sulfoximine, BSO), il a été possible de moduler de façon contrôlée l'importance relative des capacités métaboliques de ces cultures et de leurs mécanismes de détoxification liés au GSH. La validation de ce modèle expérimental qui reposait sur le potentiel de réponse à une hépatotoxine de référence (le paracétamol) montre que les cultures primaires d'hépatocytes de rat constituent un modèle unique pour l'étude du métabolisme et de l'hépatotoxicité des xénobiotiques.

A) La mise au point d'une méthode sensible de dosage de la cocaïne et de la norcocaïne par HPLC appliquée à l'évaluation du métabolisme oxydatif de la cocaïne dans les cultures primaires d'hépatocytes de rat a permis de montrer que l'induction *in vivo* (par l'Aroclor 1254) ou l'inhibition *in vitro* (par le SKF 525A) du cytochrome P-450 modulait la vitesse de biotransformation de la cocaïne en norcocaïne et en métabolites ultérieurs. Par ailleurs une étroite corrélation existait entre le degré de conversion métabolique de la cocaïne et le nombre de liaisons irréversibles d'un intermédiaire réactif issu de cette biotransformation à des macromolécules hépatocellulaires. En outre l'induction du métabolisme de la cocaïne ou de la norcocaïne par les cytochromes P-450 était associée à une inhibition de la biosynthèse protéique dans ces cellules qui pouvait être restaurée à la normale en bloquant le métabolisme oxydatif par le SKF-525A. La déplétion du GSH intracellulaire par la BSO augmentait le nombre de liaisons de covalence ainsi que l'inhibition de la biosynthèse protéique. Cependant la cocaïne n'altérait pas l'intégrité de la membrane plasmique (absence d'effet sur la fuite de lactate déshydrogénase dans le milieu de culture), mais pouvait affecter le transport des acides biliaires comme le montre l'inhibition de l'uptake de taurocholate dans les cellules.

Ces résultats indiquent qu'une forte proportion de la cocaïne intracellulaire est convertie en un métabolite réactif qui se lie irréversiblement aux macromolécules. Ces liaisons covalentes sont associées à la détérioration des fonctions hépatocellulaires et pourrait jouer un rôle dans l'hépatotoxicité induite par la cocaïne. La métabolisation oxydative de la cocaïne est donc une étape nécessaire à l'apparition du dysfonctionnement hépatique.

B) Une étude similaire pour la cyclosporine A (SIM) a été réalisée à la fois *in vivo* (1) et *in vitro* (2).

(1) Le SIM a été administré par voie orale à des rats Wistar pendant 10 jours à raison de 50 mg/Kg/j avec ou sans co-administration d'Aroclor 1254. L'hépatotoxicité induite par le SIM apparaissait après 5 jours et s'amplifiait après 10 administrations de SIM. Elle se manifestait essentiellement par une réduction des protéines plasmatiques totales, une hyperbilirubinémie et une augmentation des acides biliaires plasmatiques. Le dosage du SIM par les techniques HPLC et RIA ont montré que l'Aroclor 1254 augmentait fortement la vitesse de métabolisation du SIM et son élimination du plasma. Cependant cette induction ne modifiait pas le degré d'hépatotoxicité induite par le SIM

(2) Les cultures d'hépatocytes provenant de rats prétraités par l'Aroclor 1254 ou par la dexaméthasone, un inducteur spécifique de la famille des gènes du cytochrome P450 responsable de la formation des métabolites primaires du SIM (M1, M17, M21), ont été incubées jusqu'à 17 h avec des concentrations variées de SIM. Les deux inducteurs augmentaient fortement le métabolisme du SIM *in vitro* mais produisaient cependant des patterns de métabolites différents. L'analyse quantitative de ces métabolites montre que l'Aroclor 1254 stimule fortement la production de M18, tandis que la dexaméthasone accroissait la formation de M1 et de M17. Dans les cultures d'hépatocytes, le SIM inhibait la biosynthèse protéique. De plus, une faible fraction de SIM tritié se liait de façon covalente aux macromolécules hépatocellulaires. Bien que la proportion de ces liaisons irréversibles étaient considérablement augmentée dans les cellules de rats induites par le dexaméthasone, le degré d'inhibition de la biosynthèse protéique ne se trouvait pas modifié. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la vitesse de biotransformation du SIM par des inducteurs du métabolisme des xénobiotiques n'est pas associé à une modification de l'expression de l'hépatotoxicité aussi bien *in vivo* que *in vitro*.

En conclusion ces études ont montré que l'hépatotoxicité induite par la cocaïne *in vitro* était intimement lié à sa biotransformation oxydative. Par contre, dans le cas de la cyclosporine A, il semble que le dysfonctionnement hépatique induit *in vivo*, de même que les altérations hépatocellulaires mises en évidence *in vitro*, soient liés à la substance mère et n'aient pas de rapport direct avec son métabolisme. Ainsi les cultures primaires d'hépatocytes de rat constituent un système expérimental unique offrant la possibilité de moduler l'effet de l'expression des cytochromes P-450 et d'étudier les effets des xénobiotiques sur la toxicité cellulaire.

ABSTRACT

The hepatocellular toxicity induced by cocaine (A) or cyclosporin A (B) and the metabolism of these two xenobiotics were studied *in vitro* using primary cultures of rat hepatocytes. A preliminary study aimed at characterizing our experimental model revealed that short-term cultures of rat hepatocytes maintained sufficiently high levels of metabolic capacity (cytochrome P-450-mediated) and antioxidative defense mechanisms (mediated by glutathione, GSH). In addition, by experimentally inducing the expression of cytochromes P-450 or by inhibiting their catalytic activity, and by using a specific inhibitor of GSH biosynthesis (buthionine sulfoximine, BSO), it was possible to modulate the relative contributions of both the biotransformation and the detoxification pathways. The validation of this experimental model, performed with the reference hepatotoxic drug, paracetamol, demonstrated that these primary cultures of rat hepatocytes may provide a useful model for the study of xenobiotic metabolism and hepatotoxicity.

A) A sensitive HPLC method for the quantitative determination of cocaine and norcocaine was developed which allowed to evaluate the oxidative metabolism of cocaine in primary rat hepatocyte cultures. Using this method we could demonstrate that induction of cytochrome P-450 *in vivo* (with Aroclor 1254) or inhibition of P-450 *in vitro* (with SKF-525A) modulated the rate of biotransformation of both cocaine and norcocaine to ultimate metabolites. Furthermore, the degree of metabolic conversion of cocaine was positively correlated with the extent of irreversible binding of a reactive cocaine metabolite to hepatocellular macromolecules. In addition, induction of cocaine or norcocaine biotransformation was associated with an inhibition of protein biosynthesis in the cultured hepatocytes which was restored to normal when the oxidative metabolism was suppressed by SKF-525A. Depletion of the intracellular GSH with BSO augmented both the extent of irreversible binding and the inhibition of protein synthesis. However, cocaine did not affect the integrity of the plasma membrane as judged by the absence of effects on lactate dehydrogenase release into the culture medium. In contrast, cocaine inhibited bile acid transport as demonstrated by a decrease in the rate of taurocholate uptake into the hepatocytes. Collectively, these results demonstrate that a large proportion of the intracellular cocaine was converted to reactive metabolites, reflected by irreversible binding to macromolecules, and that this metabolic activation was associated with a deterioration of hepatocellular function that could play a role in cocaine-induced hepatic injury. Thus, the oxidative metabolism of cocaine is a necessary step for the evolution of hepatocellular

dysfunction.

B) A similar study was designed to study the metabolism and toxicity of cyclosporin A (SIM) both *in vivo* (1) and *in vitro* (2).

(1) SIM was orally administered to Wistar rats for 10 days (50 mg/kg/day) with or without co-administration Aroclor 1254. SIM-induced hepatotoxicity appeared after 5 days and was enhanced after 10 administrations of SIM. Hepatic toxicity was apparent as a decrease of total plasma proteins, hyperbilirubinemia, and increased levels of plasma bile acids. Quantitative determination of SIM plasma concentrations by both HPLC and radioimmunoassay clearly demonstrated that Aroclor 1254 markedly increased the rate of SIM metabolism and plasma elimination. However, this induction did not change the degree of SIM-induced hepatotoxicity.

(2) Hepatocyte cultures derived from rats pretreated with either Aroclor 1254 or with dexamethasone, a selective inducer of the cytochrome P-450III_A that is responsible for the formation of primary metabolites (M1, M17, and M21), were incubated with various concentrations of SIM for up to 17 hr. The two inducing agents greatly increased SIM metabolism *in vitro*, producing, however different metabolite patterns. Quantitative analysis of the metabolites demonstrated that Aroclor 1254 pretreatment markedly stimulated the formation of M18, whereas dexamethasone pretreatment increased the formation of M1 and M17. Furthermore, SIM inhibited protein biosynthesis in the hepatocytes. In addition, a small fraction of tritiated SIM formed irreversible adducts with hepatocellular macromolecules. Although the fraction of irreversibly bound SIM was considerably increased in cells from dexamethasone-pretreated rats, the degree of inhibition of the protein biosynthesis remained unaffected. Collectively, these results suggest that increased rates of SIM biotransformation following induction of xenobiotic metabolism was not associated with a change in the expression of hepatotoxicity both *in vivo* and *in vitro*.

In conclusion, these studies demonstrated that the hepatocellular toxicity induced by cocaine *in vitro* was closely related to the drug's oxidative biotransformation. In contrast, hepatic dysfunction induced by cyclosporin A *in vivo*, as well as the functional changes in cultured hepatocytes, were linked with the parent compound and were not dependent on oxidative metabolism. Thus, primary rat hepatocyte short-term cultures provide an unique experimental system to modulate the expression of cytochromes P-450 and to study the effects of xenobiotics on the cellular toxicity.