

4

Stress oxydant et maladies alcooliques du foie

Au niveau du foie, organe principal du métabolisme, l'éthanol est susceptible d'entraîner diverses lésions telles que la stéatose, la nécrose, l'hépatite alcoolique aiguë, la fibrose ou la cirrhose. Les mécanismes impliqués dans le développement des maladies hépatiques chroniques d'origine alcoolique demeurent encore une énigme. Néanmoins, la fréquence de ces maladies est liée à la dose et à la durée de l'alcoolisation. De plus, divers facteurs génétiques et environnementaux contribuent à l'expression variable des alcoolopathies en relation avec la dose consommée par différentes populations.

Mécanismes du stress oxydant

De nombreux arguments montrent que l'alcool est responsable au niveau hépatique d'un stress oxydant résultant d'une perturbation du rapport prooxydants/antioxydants, le stress oxydant pouvant ainsi résulter d'une hyperproduction de radicaux libres ou d'une diminution de la défense antioxydante. Le stress oxydant est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies chez l'homme (cancers, maladies cardiovasculaires, maladies neuro-dégénératives...). De même, le stress oxydant pourrait représenter un facteur pathogénique essentiel dans la survenue des atteintes hépatiques liées à l'alcool.

Production des radicaux libres lors de l'alcoolisation

Les radicaux les plus importants à considérer en biologie sont dérivés de l'oxygène et formés lors de la séquence de réduction monovalente de cet élément. L'addition d'un électron à l'oxygène conduit au radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), peu réactif par lui-même, mais représentant un précurseur d'espèces plus agressives. La dismutation du radical superoxyde catalysée par la superoxyde dismutase conduit en effet à la synthèse de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui peut participer à la biosynthèse du radical hydroxyle ($\cdot OH$) : ce dernier réagit avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant dans son voisinage immédiat. Le radical $\cdot OH$ apparaît ainsi comme l'espèce réactive

ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (Halliwell et Gutteridge, 1986). Ce radical $\bullet\text{OH}$ peut être formé à partir de H_2O_2 par la réaction de Fenton à laquelle participe un métal de transition tel que le fer.

L'administration d'éthanol provoque une augmentation de la production hépatique des dérivés réduits de l'oxygène $\text{O}_2\bullet$, H_2O_2 et $\bullet\text{OH}$ au niveau de nombreux sites cellulaires, par différents systèmes enzymatiques (Nordmann et coll., 1992). Ces espèces sont encore appelées « dérivés réactifs de l'oxygène » (DRO). Leurs principaux sites de production au cours de l'alcoolisation sont représentés par les microsomes, les mitochondries et les cellules de Kupffer. Les systèmes impliqués comportent les chaînes respiratoires microsomaux et mitochondriales, et la NADPH oxydase.

Chaîne respiratoire microsomale

Les travaux initiaux de Lieber et De Carli (1970) ont montré que l'alcoolisation chronique entraîne une augmentation de l'oxydation de l'éthanol liée à l'induction d'une isoenzyme du cytochrome P450 localisée dans le réticulum endoplasmique, le P450_{2E1} (CYP2E1). Inductible par l'alcool, il est générateur de DRO issus de la réduction d' O_2 en présence de NADPH. Des études récentes montrent que les cytochromes tels que les CYP3A sont également inductibles par l'éthanol et impliqués dans le métabolisme de l'éthanol et dans la production de DRO (Niemelä et coll., 2000 ; Puntarulo et Cederbaum, 1998).

Les dérivés réduits de l'oxygène ne sont pas les seuls radicaux produits lors de l'oxydation de l'éthanol par le CYP2E1 : des dérivés radicalaires carbone-centrés ont été détectés, possédant leur propre réactivité (Albano et coll., 1991). Le radical α -hydroxyéthyle ($\bullet\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$), d'abord caractérisé *in vitro* dans des préparations microsomales, a été identifié dans la bile de rats. Cette identification a été rendue possible par l'administration simultanée d'éthanol et d'un capteur de *spin*, transformant le radical 1-hydroxyéthyle en un radical plus stable, détectable grâce à la résonance paramagnétique électronique (RPE).

Chaîne respiratoire mitochondriale

L'une des sources physiologiques majeures de radicaux superoxydes est représentée par la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette production d' $\text{O}_2\bullet$ résulte des fuites électroniques lors du transfert des électrons par les complexes de la chaîne respiratoire. Lors de l'intoxication aiguë et chronique par l'éthanol, une augmentation de la production d'anions superoxydes est observée dans la mitochondrie de foie de rat (Sinaceur et coll., 1985 ; Kukielka et coll., 1994). Cette hyperproduction pourrait être liée à un effet désorganisateur de l'alcool sur les membranes mitochondriales, à l'augmentation du flux de NADH due au métabolisme de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase (ADH) et l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), à la diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire et à la diminution du système de défense représenté par le glutathion (GSH). Par ailleurs, le *tumor necrosis factor*

(TNF) α , une cytokine proinflammatoire, entraîne une élévation de la synthèse intracellulaire d' $O_2 \cdot^-$ (Hennet et coll., 1993). L'augmentation du TNF α a souvent été décrite dans certaines conditions d'alcoolisation expérimentale et humaine, et peut contribuer à l'hyperproduction de radicaux libres par les mitochondries au cours de l'alcoolisation.

NADPH oxydase

Une autre source importante de radicaux libres est représentée par l'activation des cellules de Kupffer consécutive à l'administration d'éthanol. Cette élévation apparaît liée à l'activation de la NADPH oxydase. Cette enzyme est un système complexe, formé du cytochrome b_{558} présent dans la membrane plasmique et de trois protéines cytosoliques ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $p21^{rac}$) migrant vers la membrane après activation des cellules de Kupffer (par exemple par le lipopolysaccharide, ou endotoxine). La NADPH oxydase ainsi constituée, localisée dans la membrane plasmique, catalyse la formation d' $O_2 \cdot^-$. Cet anion superoxyde libéré à l'intérieur de la cellule se dismute rapidement en H_2O_2 . La même réaction a lieu dans la vacuole de phagocytose et conduit à la production de radicaux libres. Une production accrue d' $O_2 \cdot^-$ par les cellules de Kupffer a été observée chez des souris recevant une charge aiguë d'éthanol (5 g/kg, intragastrique) (Pertoft et Smedsrod 1987). De plus, l'éthanol stimule la formation d' $O_2 \cdot^-$ liée à l'activation des cellules de Kupffer par le liposaccharide (Dieter et coll., 1986). Le rôle majeur des radicaux libres générés par les cellules de Kupffer a été confirmé lors de l'inactivation de ces cellules par le chlorure de gadolinium (ClGd). Le prétraitement par le ClGd des rats alcoolisés selon le modèle de Tsukamoto et French (seul modèle d'alcoolisation du rat conduisant à des lésions histologiques hépatiques sévères) bloque la formation du radical α -hydroxyéthyle (Knecht et coll., 1995). Par ailleurs, l'administration aiguë d'éthanol active la NADPH oxydase des cellules de Kupffer (Bautista et Spitzer, 1999). De plus, l'inactivation de la sous-unité $p47^{phox}$ de la NADPH oxydase (Kono et coll., 2000) prévient la formation des radicaux libres mesurés dans la bile par RPE chez les souris alcoolisées selon le modèle de Tsukamoto et French. L'ensemble de ces résultats montre que la NADPH oxydase des cellules de Kupffer représente une source majeure de radicaux libres lors de l'alcoolisation.

Bien que l'endotoxémie d'origine intestinale (augmentation de l'endotoxine plasmatique associée à une modification de la perméabilité intestinale) semble être le facteur clé dans l'activation des cellules de Kupffer, le rôle de l'éthanol et des produits de la lipoperoxydation est à considérer. L'activation des cellules de Kupffer conduisant à l'augmentation de l'expression des gènes des cytokines met en jeu la translocation de la protéine kinase C (PKC) dépendante du récepteur de l'endotoxine, mais également de l'augmentation de l'influx de Ca_i^{2+} liée à l'éthanol ou à l'hypoxie (Lands, 1995). La PKC induit la translocation de la NADPH oxydase au niveau de la membrane plasmique, entraînant la formation des dérivés réactifs de l'oxygène. Ces DRO sont impliqués dans l'activation de facteurs de transcription tels que NF κ B (*nuclear factor* κ B), et donc dans l'augmentation de l'expression des gènes de certaines

cytokines proinflammatoires. L'augmentation de l'expression de certaines cytokines par les cellules de Kupffer a été observée même en absence d'une endotoxémie marquée, suggérant la participation de facteurs autres que l'endotoxine (Afford et coll., 1998). Les adduits protéiques de type MAA (*malonaldehyde acetaldehyde adduct*), résultant de la réaction entre des protéines et les aldéhydes (acétaldéhyde et malondialdéhyde), sont des ligands potentiels des récepteurs spécifiques du mannose des cellules de Kupffer (Klassen et Thiele, 1998 ; Bautista, 2000) ; leur activation entraîne une séquence de transduction de signaux similaires à ceux induits par l'endotoxine.

Il est encore difficile de mesurer, d'après la littérature, l'importance relative jouée par chaque système générateur de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène dans la toxicité de l'alcool.

Rôle du fer dans la génération des radicaux libres

La production tissulaire d' \bullet OH dépend largement de la présence de fer susceptible d'agir en tant que catalyseur des réactions radicalaires.

Teneurs en fer

De nombreuses études ont montré que l'alcoolisation aiguë ou chronique détermine une augmentation du fer non héminique au niveau hépatique (Houzé et coll., 1991 ; Conde-Martel et coll., 1992 ; Gonzalez-Reimers et coll., 1996 ; Shahbazian et coll., 1994). Parmi les mécanismes impliqués dans les altérations du métabolisme du fer, l'augmentation de la captation du fer lié à la transferrine ou de la transferrine partiellement sialylée pourrait jouer un rôle fondamental. Des études ont mis en évidence une augmentation de la vitesse de captation hépatique du fer de la transferrine marquée par le ^{59}Fe lors d'une charge aiguë en éthanol (Rouach et coll., 1994). L'administration d'allopurinol (un capteur de radicaux libres) prévient à la fois l'augmentation de la captation du fer, l'élévation du fer non héminique et les principaux stigmates biologiques du stress oxydant au niveau hépatique chez des rats recevant une charge aiguë en éthanol. Ces travaux suggèrent que les radicaux libres générés lors du métabolisme de l'éthanol favorisent la captation du fer lié à la transferrine.

Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés au cours de l'alcoolisation chronique des rats. La captation du fer lié à la transferrine est inchangée ou diminuée (Batey et Johnston, 1993). Il faut considérer que la transferrine partiellement désialylée (ou asialotransferrine) libère plus rapidement le fer dans les tissus que la transferrine native (Regoeczi et coll., 1984 ; Begin et coll., 1988), et que l'alcoolisation chronique s'accompagne généralement d'une élévation de l'asialotransferrine. Quel qu'en soit le mécanisme, l'augmentation de la captation du fer peut contribuer à l'accumulation modérée et progressive du fer hépatique observée dans certaines conditions d'alcoolisation expérimentale. Cependant, dans certaines études la concentration en fer

hépatique a été trouvée inchangée (Kawase et coll., 1989) voire diminuée (Rouach et coll., 1997) chez les rats alcoolisés alors qu'un stress oxydant sévère était apparent chez ces derniers.

Une augmentation du fer non héminique (Tsukamoto et coll., 1999) a également été décelée dans les cellules de Kupffer de foie de rats alcoolisés. Cet effet est vraisemblablement lié à l'augmentation de la phagocytose des hématies, dont la demi-vie est diminuée en réponse aux altérations oxydatives de leurs membranes. Cette augmentation du fer est associée à une augmentation de la production de radicaux libres, à l'activation du NFkB et à l'induction de la synthèse de TNF α dans les cellules de Kupffer. Le traitement de ces cellules *ex vivo* par un chélateur du fer (L₁, deferiprone) normalise tous ces paramètres. Ces résultats montrent que le fer joue un rôle essentiel dans l'activation de NFkB et l'expression des gènes de cytokines proinflammatoires. Ces perturbations du métabolisme du fer peuvent jouer un rôle essentiel dans les hépatopathies alcooliques.

Les hépatopathies alcooliques sont associées à des altérations de l'homéostasie du fer. Ces altérations comportent des modifications du *turn over* du fer sérique et une surcharge hépatique en fer (Potter, 1991). Chapman et coll. (1983) ont observé une augmentation de la captation du ⁵²Fe de la transferrine chez des sujets atteints d'une stéatose ou d'une cirrhose alcoolique. La concentration de fer sérique est augmentée et corrélée à la captation de fer chez les patients consommateurs excessifs. De plus, la surcharge hépatique en fer apparaît corrélée à la stéatose plutôt qu'à la fibrose (Chapman et coll., 1983). Des résultats variables ont été retrouvés quant à la sidérose chez les consommateurs excessifs atteints d'une cirrhose (Rodriguez-Moreno et coll., 1997 ; Milman et coll., 1986 ; Farinati et coll., 1995). Néanmoins, il s'avère que la surcharge en fer observée lors d'hépatopathies alcooliques est modérée, excédant rarement 2 à 3 fois la valeur normale.

Forme active « fer libre »

Outre l'importance de la teneur en fer, la mobilisation du fer de ses sites de stockage apparaît être le paramètre déterminant dans la biosynthèse des radicaux libres agressifs et la genèse du stress oxydant. Pour exercer une fonction catalytique, le fer doit se trouver sous une forme particulière de chélates de faible poids moléculaire Fe-f(PM), également désignée « fer libre » ou « fer redox actif ». Le Fe-f(PM) représente la forme métaboliquement active du fer.

Il a été établi que la charge aiguë en éthanol ou l'alcoolisation chronique a pour conséquence une élévation significative du Fe-f(PM) dans la fraction cytosolique obtenue à partir d'homogénats hépatiques (Rouach et coll., 1990 ; Nordmann et coll., 1990). Une élévation du Fe-f(PM) a également été décrite dans les hépatocytes de rat en culture primaire mis en présence d'éthanol (Sergent et coll., 1995). Les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la fraction Fe-f(PM) pourraient être liés à la mobilisation du fer de la ferritine

favorisée par un environnement réducteur, tel que celui créé par le métabolisme de l'éthanol par la voie de l'alcool déshydrogénase (ADH) (Shaw et coll., 1988). La production accrue de radicaux superoxydes lors de l'oxydation de l'alcool par les voies non-ADH pourrait, elle aussi, contribuer à cette mobilisation, car il a été établi que ces radicaux permettent la libération du fer stocké dans la ferritine (Thomas et coll., 1985). Des études récentes ont mis en évidence que le superoxyde a pour cible des *clusters* 4Fe-4S de déshydratases telles que l'aconitase et que l'oxydation de ces *clusters* a pour conséquence un relargage intracellulaire de fer libre sous forme Fe^{2+} (Liochev et Fridovich, 1997). Quel que soit le mécanisme de la libération du « fer libre », celle-ci joue vraisemblablement un rôle fondamental dans la catalyse des réactions radicalaires.

Systèmes antioxydants

Les organismes aérobies sont protégés par un système de défense contre les dommages oxydants induits par les radicaux libres. Ce système antioxydant inclut des enzymes (catalase, glutathion peroxydase, glutathion transférase, superoxyde dismutase) et les systèmes de séquestration des métaux prooxydants (fer, cuivre). Par ailleurs, des composés hydrophiles et lipophiles (vitamine C et E, GSH), qui agissent en piégeant ou en supprimant la génération de radicaux libres, sont importants dans le contrôle de l'homéostasie redox intracellulaire. Des éléments traces tels que le zinc et le sélénium participent également à la défense antioxydante.

Vitamines C et E

De nombreuses études ont montré que la teneur en vitamine E et en vitamine C diminue lors de l'alcoolisation. À titre d'exemple, une diminution de la vitamine C est observée dans le testicule de rat après administration de l'éthanol (Bakpinar et Tugrul, 1995). Chez des volontaires sains, un prétraitement par la vitamine C (1 g/j pendant 3 jours) diminue la toxicité de l'éthanol observée après une consommation de 84 g d'alcool (Wickramasinghe et Hasan, 1994). L'administration chronique d'éthanol détermine une augmentation du radical ascorbyl (mesure proposée pour l'évaluation du stress oxydant, Buettner, 1993) dans la bile de rats alcoolisés (Reinke et coll., 1997). L'administration chronique d'éthanol détermine une diminution du contenu en vitamine E dans les fractions mitochondriales et microsomaux hépatiques, ainsi que dans les cellules de Kupffer (Takeyama et coll., 1996). Une diminution de la vitamine E sérique est observée chez les patients consommateurs excessifs avec ou sans atteintes hépatiques (Bjorneboe et Bjorneboe, 1993) et dans le foie de patients consommateurs excessifs porteurs d'une cirrhose (Bell et coll., 1992).

Glutathion

Concernant le glutathion (GSH), les résultats sont divergents quant à l'effet de l'alcoolisation sur les taux de GSH, de GSSG (glutathion oxydé) et du rapport GSH/GSSG hépatique. Ces résultats variables apparaissent liés aux modalités d'alcoolisation, aux doses d'alcool administrées ainsi qu'à l'âge et au sexe des animaux. En effet, une étude récente (Colantoni et coll., 2000) révèle que les variations du GSSG consécutives à l'alcoolisation chronique dépendent des hormones sexuelles. Alors que le rapport GSH/GSSG n'est pas modifié chez les rats mâles, une diminution de ce rapport liée à une élévation du GSSG est observée chez les femelles. Ces résultats confirment la grande sensibilité des femelles au stress oxydant et aux atteintes tissulaires consécutives à l'alcoolisation chronique.

L'influence de l'âge apparaît également jouer un rôle déterminant dans les altérations des antioxydants. Il y a plus de quarante ans que Harman (1956) a postulé que le vieillissement est la conséquence d'une altération progressive des différents constituants cellulaires sous l'effet des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène. L'étude de Calabrese et coll. (1998) montre une synergie entre le vieillissement et l'alcool quant aux perturbations des systèmes antioxydants. Cette étude montre d'une part une diminution du GSH chez les rats âgés de 25 mois et d'autre part que l'ingestion d'éthanol durant 25 mois amplifie la baisse du GSH, et l'augmentation du GSSG et des stigmates du stress oxydant.

Outre l'importance du GSH total hépatique, un rôle vital est dévolu au contenu en GSH mitochondrial. Une déplétion du GSH mitochondrial déclenche une accumulation de radicaux libres, cette déplétion mitochondriale étant létale alors que celle du cytosol n'affecte pas la viabilité cellulaire (Sagara et coll., 1998). Les mitochondries, n'ayant pas la capacité de synthétiser le GSH, l'importent du cytosol grâce à des transporteurs spécifiques. L'intoxication alcoolique entraîne une diminution spécifique du GSH mitochondrial par une inhibition de son transporteur membranaire (Fernandez-Checa et coll., 1991, 1997 ; Garcia-Ruiz et coll., 1994). La baisse du GSH mitochondrial a des conséquences notables sur la fonction de la mitochondrie et sur la survie de la cellule (apoptose, nécrose).

Conséquences du stress oxydant

Lorsque l'équilibre prooxydants/antioxydants est perturbé au profit du numérateur, il s'établit un stress oxydant. L'éventail des modifications qui peuvent survenir en réponse au stress oxydant est bien documenté et comprend, entre autres, l'augmentation de la lipoperoxydation, de l'oxydation des protéines et des altérations de l'ADN.

Lipoperoxydation

L'existence du stress oxydant, traduite notamment par une exacerbation de la lipoperoxydation, a été décelée depuis de nombreuses années au niveau hépatique dans certaines conditions d'alcoolisation expérimentale ou humaine. Il est à noter que des controverses, liées pour une large part aux problèmes inhérents à la spécificité des techniques utilisées pour la mesure de la lipoperoxydation, ont été rapportées dans la littérature. Cependant, l'utilisation de méthodes non invasives a apporté des arguments en faveur de l'existence d'un stress oxydant lors de certaines modalités d'alcoolisation. Il en est ainsi de l'augmentation de l'éthane et du pentane (produits finaux de la décomposition des lipoperoxydes) dans l'air exhalé des rats alcoolisés. D'autre part, la mise en évidence de radicaux libres carbone-centrés issus de la destruction peroxydative des acides gras polyinsaturés a permis de prouver, de façon incontestable, l'accroissement de la lipoperoxydation hépatique chez le rat soumis à une alcoolisation prolongée associée à un régime hyperlipidique (Reinke et coll., 1987).

Les résultats variables concernant l'intensité de la lipoperoxydation apparaissent liés aux apports nutritionnels et plus particulièrement à la richesse du régime en vitamine E (Kawase et coll., 1989), en fer (Tsukamoto et coll., 1995 ; Rouach et coll., 1988) et en acides gras polyinsaturés (Nanji et coll., 1994a, 1995a). Lors de l'alcoolisation des rats selon le modèle de Lieber, l'accroissement de la lipoperoxydation n'est apparent que si le régime est appauvri en vitamine E (Kawase et coll., 1989). À l'inverse, une supplémentation en vitamine E prévient l'élévation de la lipoperoxydation consécutive à l'alcoolisation (Odeleye et coll., 1991). Il a été largement montré chez les rats surchargés en fer (à l'aide d'un régime enrichi en fer carbonyle) que l'administration aiguë ou chronique d'éthanol potentialise les altérations de la lipoperoxydation et de la défense antioxydante (Tsukamoto et coll., 1995 ; Rouach et coll., 1988). Les travaux de Nanji et coll. (1994a, 1995a) montrent que la nature des acides gras joue un rôle prépondérant dans l'exacerbation de la lipoperoxydation liée à l'intoxication alcoolique. Alors qu'un régime riche en lipides saturés protège contre l'apparition d'un stress oxydant, une alimentation à base d'huile de maïs (riche en acide linoléique n-6) ou d'huile de poissons (riche en acide gras de la famille n-3) potentialise les altérations peroxydatives liées à l'intoxication alcoolique.

Les produits de la peroxydation sont des aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE). À la différence des radicaux libres, ces aldéhydes sont stables, diffusent à l'intérieur et hors de la cellule et peuvent réagir avec des cibles éloignées de leur site de formation. Ils ne sont pas les produits finaux de la peroxydation, agissent également en tant que « seconds messagers cytotoxiques » et apparaissent impliqués dans la plupart des effets physiopathologiques associés au stress oxydant (Uchida, 2000). La plupart de ces aldéhydes présentent une forte réactivité vis-à-vis de biomolécules telles que les protéines, l'ADN et les phospholipides, générant ainsi des

produits stables contribuant à la pathogénie des atteintes tissulaires. La formation des aldéhydes (MDA, HNE) et la formation subséquente d'adduits aux protéines a largement été décrite lors d'alcoolisation expérimentale ou humaine (Viitala et coll., 2000). Ces adduits représentent des marqueurs putatifs du stress oxydant. Lors de l'alcoolisation, l'acétaldéhyde (A) généré durant le métabolisme de l'éthanol réagit également avec les protéines pour former des adduits simples (*acetaldehyde adducts*) ou mixtes MAA (*malondialdehyde, acetaldehyde adducts*). Des anticorps dirigés contre les adduits de type AA ou MAA ont été retrouvés dans le sang des rats alcoolisés (Viitala et coll., 2000). Ces réponses auto-immunes jouent vraisemblablement un rôle pathogénique.

Les travaux de Yokohama et coll. (1995) ont montré la présence d'une fibrose hépatique lors de l'alcoolisation de cochons d'Inde préimmunisés par les adduits AA. Des anticorps dirigés contre les adduits de type AA (Niemelä et coll., 2000) et de type MAA sont retrouvés chez les patients consommateurs excessifs présentant des atteintes hépatiques, d'une manière associée à la sévérité de l'atteinte hépatique (Viitala et coll., 2000). Il a été suggéré que les mécanismes immunitaires seraient impliqués dans le défaut d'amélioration de l'état clinique de patients présentant des atteintes hépatiques, et ce malgré le sevrage (Marshall et coll., 1983).

Le HNE est doté d'une réactivité particulière : il induit une myriade d'effets délétères au niveau de la cellule, tels que l'altération du glutathion, des protéines sulfhydryles et des enzymes contenant des fonctions thiols (-SH). Des travaux récents montrent que le HNE est un inducteur spécifique de l'expression de la COX2 (cyclooxygénase 2) (Kumagai et coll., 2000). L'augmentation de l'ARNm de la COX2 est associée à l'augmentation de la lipoperoxydation et de la sévérité des atteintes hépatiques chez les rats alcoolisés selon le modèle de Tsukamoto et French (Nanji et coll., 1997).

Oxydation des protéines

Les protéines sont également des cibles pour les radicaux libres (Remmer et coll., 1989). Dean et coll. (1991) ont montré que les protéines pouvaient être attaquées par les radicaux libres même à des concentrations très élevées en antioxydants (vitamine E, trolox), conditions pour lesquelles le processus de lipoperoxydation est presque supprimé. De même, Davies et Goldberg (1987) ont montré que l'oxydation des protéines apparaissait de façon précoce par rapport à la lipoperoxydation. Un stress oxydant peut être à l'origine de l'oxydation de la chaîne latérale de certains acides aminés constitutifs des protéines. D'une manière générale, l'oxydation des protéines est mise en évidence par l'augmentation des groupements carbonyles (-CHO) et l'oxydation des groupements thiols. Si l'oxydation radicalaire touche des acides aminés localisés au site actif des enzymes, ceci peut entraîner leur inactivation. Les enzymes sensibles à l'attaque radicalaire sont souvent des enzymes clés du métabolisme.

Rouach et coll. (1997) ont montré une diminution du contenu en groupements sulfhydryles aussi bien dans les protéines membranaires que dans les protéines cytosoliques des rats alcoolisés. Pompella et coll. (1991) ont montré qu'une diminution des fonctions thiols pouvait résulter de l'attaque des groupements sulfhydryles des protéines membranaires par des radicaux lipoperoxydes ou par les aldéhydes issus de la lipoperoxydation tels que le 4-HNE. La perte des fonctions thiols dans les membranes peut perturber les fonctions cellulaires et contribuer ainsi au développement de l'atteinte hépatique. L'augmentation des fonctions carbonylées des protéines a été également mise en évidence lors de l'alcoolisation de rats dans divers modèles (Rouach et coll., 1997 ; Colantoni et coll., 2000). Des concentrations élevées en protéines carbonylées ont été retrouvées dans le plasma et les érythrocytes de patients alcooliques (Grattagliano et coll., 1995, 1996 ; Mutlu-Türkoglu et coll., 2000).

Les protéines oxydées ou altérées peuvent subir un repliement anormal et former des agrégats protéiques cytosoliques. Néanmoins, les protéines chaperons facilitent le repliement des protéines et favorisent ainsi le maintien de leurs fonctions tout en évitant la formation d'agrégats entre les domaines hydrophobes. Diverses protéines chaperons sont induites dans des conditions de stress oxydant et peuvent représenter un mécanisme de protection contre l'accumulation de protéines anormales et non fonctionnelles dans les différents compartiments cellulaires. L'augmentation de l'ARNm de HSP₇₀ (*heat shock protein*) chez les rats alcoolisés selon le modèle de Tsukamoto et French apparaît corrélée à l'intensité du stress oxydant. Cette augmentation adaptative des protéines chaperons peut favoriser le repliement des protéines altérées ou leur dégradation (Nanji et coll., 1995b).

Néanmoins, ces protéines oxydées ou altérées peuvent s'accumuler en réponse à une diminution de leur dégradation par les protéases alcalines. Parmi les protéases alcalines, le protéasome 26S semble constituer la principale machinerie protéolytique intracellulaire non lysosomale. La dégradation des protéines par le système ubiquitine/protéasome est fortement régulée. Elle dépend des substrats, de la cascade des enzymes de l'ubiquitinylation et des activités du protéasome.

Au-delà de son rôle reconnu dans l'élimination des protéines anormales, oxydées ou surnuméraires, le protéasome intervient dans la protéolyse régulée de nombreuses protéines contrôlant des processus biologiques importants (cycle cellulaire, voies de réparation de l'ADN, régulation des réponses immunitaires et inflammatoires, apoptose et modulation de l'expression des récepteurs de surface). Étant donné les fonctions clés du protéasome, il n'est pas surprenant que des dysfonctionnements de la machine protéolytique soient impliqués dans des pathologies variées, incluant le cancer et certaines infections. Des travaux récents (Fataccioli et coll., 1999) ont montré une inhibition de deux activités du protéasome (*chymotrypsin-like* et *peptidylglutamyl-peptide hydrolase*) lors de l'alcoolisation chronique des rats selon le modèle de

Tsukamoto et French. La diminution des activités du protéasome peut représenter un des mécanismes conduisant à l'accumulation de protéines fortement modifiées, lesquelles peuvent déterminer des altérations des fonctions vitales cellulaires.

Altérations de l'ADN

La consommation chronique d'éthanol génère différentes classes de molécules (radicaux libres, produits de la lipoperoxydation et acétaldéhyde) également susceptibles de léser l'ADN. L'augmentation du flux de radicaux libres peut générer une variété de lésions de l'ADN incluant fragmentation de l'ADN, modifications oxydatives des bases (8-hydroxydésoxyguanosine) et diverses mutations. De plus, les produits de la lipoperoxydation réagissent avec l'ADN pour former divers types d'adduits tels que des éthénobases. L'acétaldéhyde réagit également avec l'ADN pour former des adduits spécifiques dont le composé prévalent est la N²-éthyl-désoxyguanosine (N²-Et-dG).

Divers travaux ont montré que l'alcoolisation expérimentale et humaine détermine des modifications notables de l'ADN mitochondrial et nucléaire (Brooks, 1997). En effet, les études d'Ishii et coll. (1996) ont montré que l'éthanol augmente la production d'H₂O₂, du stress oxydant et de la fragmentation de l'ADN dans les hépatocytes. De plus, l'administration aiguë ou chronique d'éthanol à des rats détermine une augmentation de la fragmentation de l'ADN (Navasumrit et coll., 2000). Cet effet est prévenu par le prétraitement, par la vitamine C (400 mg/kg par voie intrapéritonéale pendant 5 jours) ou la vitamine E (100 mg/kg par voie intrapéritonéale pendant 5 jours), des animaux recevant une charge aiguë en éthanol (5 g/kg). Ces résultats suggèrent que les dommages de l'ADN sont liés à la formation d'oxydants réactifs.

De plus, des études ont révélé que l'intoxication alcoolique aiguë ou chronique détermine des atteintes oxydatives de l'ADN mitochondrial ainsi qu'une déplétion en ADN mitochondrial (Wieland et Lauterburg, 1995). L'ADN mitochondrial est plus sensible à l'attaque radicalaire que l'ADN nucléaire. Diverses délétions de l'ADN mitochondrial hépatique ont été rapportées chez des sujets alcooliques, et des associations entre ces délétions et la stéatose microvésiculaire ont été observées (Fromenty et coll., 1995 ; Mansouri et coll., 1997). Il existe des arguments suggérant qu'un stress oxydant intense au niveau mitochondrial pourrait être responsable de la survenue d'une stéatose microvésiculaire.

Les études épidémiologiques et expérimentales montrent que l'acétaldéhyde est une substance mutagène. Un des mécanismes d'action peut impliquer sa réaction avec l'ADN. Grâce à l'utilisation de techniques analytiques sensibles, Fang et Vaca (1995) ont montré la présence de N²-Et-dG dans l'ADN de foie de souris recevant pendant 6 semaines de l'éthanol à 10 % dans l'eau de boisson. Cette dernière observation suggère qu'une consommation même

modérée d'alcool peut induire des lésions de l'ADN et incite à rechercher des altérations de l'ADN chez les consommateurs modérés de boissons alcooliques.

Stress oxydant et hépatopathies

Le rôle d'un stress oxydant dans l'hépatotoxicité de l'éthanol a donné lieu à de nombreuses controverses. Néanmoins, on a assisté au cours de la dernière décennie à un regain d'intérêt pour le rôle du stress oxydant dans les alcoolopathies.

Études expérimentales chez le rat

Un modèle d'alcoolisation, permettant l'administration d'éthanol associée à un régime hyperlipidique à l'aide d'une sonde intragastrique, conduit chez le rat à des lésions histologiques voisines de celles observées lors des formes sévères d'hépatopathies chez l'homme (stéatose, inflammation, fibrose et nécrose) (Tsukamoto et coll., 1986). Ces lésions s'accompagnent d'une induction du CYP2E1 et des stigmates d'un stress oxydant. Ces stigmates consistent en une baisse du GSH et en un accroissement considérable de la lipoperoxydation, ainsi qu'en des altérations oxydatives des protéines (Rouach et coll., 1997). L'accumulation des protéines oxydées peut résulter d'une majoration de leur oxydation par les radicaux libres ou de la diminution de leur dégradation par le protéasome.

Les altérations histologiques observées apparaissent liées au stress oxydant. Il existe en effet une corrélation significative entre le score pathologique (traduisant la sévérité des altérations anatomopathologiques) et les paramètres du stress oxydant (Rouach et coll., 1997 ; Fataccioli et coll., 1999 ; French et coll., 1993 ; Kamimura et coll., 1992 ; Nanji et coll., 1994a). De plus, l'alimentation enrichie d'une part en acides gras polyinsaturés et d'autre part en fer stimule la lipoperoxydation et aggrave les atteintes hépatiques (Tsukamoto et coll., 1995 ; Nanji et coll., 1994b). À l'inverse, l'action d'antioxydants réduit les effets cytotoxiques de l'éthanol. Il en est ainsi de la S-adénosylméthionine, un précurseur du glutathion et principal donneur de méthyle dans les réactions de transméthylation (Lieber, 1997). L'effet protecteur de la S-adénosylméthionine apparaît plutôt lié à ses effets sur la membrane mitochondriale qui favoriseraient ainsi le transport du GSH et le maintien d'un taux normal du GSH mitochondrial. En effet, l'administration de S-adénosylméthionine restaure le contenu en GSH mitochondrial et protège contre les atteintes hépatotoxiques consécutives à l'administration d'éthanol (Garcia-Ruiz et coll., 1995). Des suppléments en zinc et en sélénium peuvent également exercer des effets bénéfiques sur la lipoperoxydation et les atteintes hépatiques. Il a été montré que la supplémentation en zinc

diminue le stress oxydant et l'accumulation du collagène (Cabré et coll., 1995), et rétablit l'activité de l'ADH gastrique et le métabolisme de l'éthanol dit de « premier passage » chez les rats alcoolisés (Caballeria et coll., 1997). Par ces divers mécanismes d'action, la supplémentation en zinc pourrait jouer un rôle important dans la prévention des atteintes hépatiques liées à l'alcoolisation.

Par ailleurs, les phosphatidylcholines polyinsaturées (PPC) extraites de soja, riches en dilinoléyl-phosphatidylcholines, exercent également des effets hépatoprotecteurs chez le babouin : l'administration de PPC prévient l'induction du CYP2E1, de la lipoperoxydation, de la fibrose et de la cirrhose secondaires à son alcoolisation chronique du babouin (Lieber et coll., 1994 ; Aleynik et coll., 1999).

Ces divers résultats, ainsi que la démonstration par immunohistochimie que les aldéhydes dérivant de la lipoperoxydation sont colocalisés dans les zones d'infiltration des lipides, de la nécrose et de la fibrose (Tsukamoto et coll., 1995 ; Niemelä et coll., 1994) confortent l'hypothèse d'une relation causale entre le stress oxydant et le développement des alcoolopathies.

Les mécanismes responsables de l'action fibrogénique de la lipoperoxydation semblent impliquer la stimulation de la synthèse du collagène par les cellules de Ito et la libération des cytokines fibrogéniques par les cellules de Kupffer (Kamimura et Tsukamoto, 1995). Une réduction de la sévérité des lésions d'inflammation et de fibrose est obtenue en administrant, au cours de l'alcoolisation, du chlorure de gadolinium, agent destructeur des cellules de Kupffer (Knecht et coll., 1995). Cette dernière observation est en accord avec le rôle fondamental de ces cellules dans l'initiation et l'extension de la fibrose hépatique (Friedman, 1993).

Études cliniques et implications thérapeutiques

Chez l'homme, les résultats des études consacrées à la recherche des stigmates d'un stress oxydant au cours des hépatopathies alcooliques sont, pour la plupart, en faveur d'un tel stress. Parmi les travaux récents, on peut citer en particulier la mise en évidence par Aleynik et coll. (1998) d'une augmentation des deux marqueurs majeurs de la lipoperoxydation *in vivo*, les F2-isoprostanés et le 4-hydroxynonénal, chez les sujets atteints d'hépatopathies alcooliques. Alors que cette étude révèle que la lipoperoxydation est liée aux atteintes hépatiques, d'autres études (Letteron et coll., 1993 ; Clot et coll., 1994) sont plutôt en faveur d'une relation entre lipoperoxydation et importance de la consommation d'alcool pendant la période d'alcoolisation. Un fait important soulevé dans l'étude d'Aleynik et coll. (1998) concerne l'exacerbation des altérations peroxydatives lors d'un sevrage de 48 heures, résultat pouvant être lié à l'absence de l'effet piègeur par l'éthanol du radical

hydroxyle. Par ailleurs, il a été montré des associations entre la formation des radicaux α -hydroxyéthyles, la stimulation de la lipoperoxydation, la formation d'adduits entre les radicaux α -hydroxyéthyles et les protéines et les atteintes hépatiques. Ces adduits ont des propriétés immunologiques conduisant à la formation d'anticorps spécifiques, qui ont été détectés dans le sang de patients alcooliques avec cirrhose, suggérant l'implication des réactions autoimmunes dans le développement des hépatopathies alcooliques (Clot et coll., 1996 ; Albano et coll., 1999). L'ensemble de ces résultats conduit à envisager l'intérêt de l'administration d'antioxydants afin de piéger les radicaux libres, de réduire l'intensité du stress oxydant et de freiner l'évolution des alcoolopathies lors d'alcoolisations massives ou intermittentes.

Des essais de supplémentation en substances antioxydantes (vitamines E et C) ont été tentés chez des patients atteints de maladies hépatiques. La supplémentation en vitamine C (2,5 g/j/10 j) au cours du sevrage réduit l'augmentation des isoprostanes urinaires chez les sujets atteints de maladies hépatiques alcooliques (Meagher et coll., 1999). De plus, cette étude révèle que l'élévation des isoprostanes urinaires est reliée aux maladies hépatiques chroniques d'origine alcoolique et très marquée chez les sujets atteints d'une hépatite alcoolique aiguë. L'administration isolée de vitamine E (500 mg/j, pendant un an) ne modifie ni les paramètres hépatiques, ni la durée d'hospitalisation, ni la mortalité chez les patients cirrhotiques (de la Maza et coll., 1995). Aucune étude ne fait état de l'administration conjointe de vitamines E et C, qui agissent en complémentarité.

Il existe peu d'études ayant évalué l'intérêt d'une supplémentation comportant les différents antioxydants qui agissent de façon synergique : zinc, sélénium, vitamine C, vitamine E, S-adénosylméthionine. En pratique clinique, le déficit en micronutriments est retrouvé dans le sang ou des fragments de biopsies hépatiques chez les sujets alcooliques. En effet, les résultats de plusieurs études montrent des déficits fréquents en sélénium, en zinc et en magnésium chez le consommateur excessif chronique avec ou sans cirrhose (Rouach, 1999). Ces altérations peuvent par elles-mêmes jouer un rôle dans la genèse du stress oxydant et dans les perturbations du métabolisme du collagène. Il semble logique de corriger ces déficits par des apports spécifiques. L'étude de Wenzel et coll. (1993), réalisée chez des patients atteints d'une maladie alcoolique hépatique sévère (*Child-Pugh* B et C), montre que la supplémentation en plusieurs antioxydants, vitamine E (600 mg), sélénium (200 mg) et zinc (12 mg), améliore les paramètres du stress oxydant, diminue la durée d'hospitalisation et la mortalité (6,5 % vs 40 % dans les groupes traité et contrôle, respectivement). Cette étude démontre l'efficacité clinique d'une supplémentation en antioxydants. Cependant, seules des études épidémiologiques portant sur une vaste population pourront préciser si des supplémentations en antioxydants (phosphatidylcholines, S-adénosyl-méthionine, vitamine C, zinc...) sont bénéfiques chez le consommateur à risque.

En conclusion, l'administration d'éthanol entraîne au niveau hépatique une élévation de la captation de fer sérique et de la mobilisation du fer de ses sites de stockage. L'action conjuguée de ces deux effets détermine une augmentation de la fraction de fer liée à des composés de faible poids moléculaire Fe-f(PM) et a des conséquences variables quant à la concentration de fer non hémunique. L'augmentation de Fe-f(PM) joue vraisemblablement un rôle essentiel dans la genèse du stress oxydant hépatique secondaire à l'alcoolisation.

Les résultats des études cliniques et expérimentales montrent que le stress oxydant hépatique lié à l'alcoolisation s'accompagne d'une augmentation de la lipoperoxydation et de l'oxydation des protéines, et d'altérations oxydantes de l'ADN. Ces altérations oxydatives agissent en synergie et déterminent une cytotoxicité. La distinction entre les effets de l'éthanol sur les lipides, les protéines et l'ADN est néanmoins artificielle. À titre d'exemple, l'augmentation de la lipoperoxydation peut résulter de l'induction du CYP2E1 et les produits de la lipoperoxydation sont à l'origine de la formation d'adduits aux protéines et à l'ADN. Le 4-hydroxynonéal (HNE), aldéhyde issu de la lipoperoxydation, représente un « second messenger cytotoxique » impliqué dans la plupart des effets physiopathologiques du stress oxydant lié à l'alcool. De même que l'acétaldéhyde provenant du métabolisme de l'éthanol, il est ainsi à l'origine de la formation d'adduits aux protéines et à l'ADN impliqués dans la cytotoxicité et les perturbations du système immunitaire.

La plupart des études montrent une association entre stigmates biologiques du stress oxydant et intensité des atteintes hépatiques secondaires à l'alcoolisation ; il est donc probable que le stress oxydant représente un facteur pathogénique essentiel dans les alcoolopathies. Ceci suggère que des suppléments en antioxydants pourraient présenter un intérêt dans la réduction du stress oxydant et la limitation de l'évolution des hépatopathies alcooliques.

BIBLIOGRAPHIE

AFFORD SC, FISHER NC, NEIL DA, FEAR J, BRUN P et coll. Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol* 1998, **186** : 82-89

ALBANO E, PERSSON JO, TERELUS Y, GORIA-GATTI L, INGELMAN-SUNDBERG M, DIANZANI MU. Role of ethanol inducible cytochrome P450 (P450IIE1) in catalysing the free radical activation of aliphatic alcohols. *Biochem Pharmacol* 1991, **41** : 1895-1902

ALBANO E, FRENCH SW, INGELMAN-SUNDBERG M. Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front Biosci* 1999, **15** : D533-D540

ALEYNIK SI, LEO MA, ALEYNIK MK, LIEBER CS. Increased circulating products of lipid peroxidation in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1998, **22** : 192-196

ALEYNIK MK, LEO MA, ALEYNIK SI, LIEBER CS. Polyenylphosphatidylcholine opposes the increase of cytochrome P-450 2E1 by ethanol and corrects its iron-induced decrease. *Alcohol Clin Exp Res* 1999, **23** : 96-100

BAKPINAR S, TUGRUL Y. Influence of selenium supplementation in non-toxic doses on testis lipid peroxide and antioxidant levels in chronic alcohol fed rats. *Alcohol Alcohol* 1995, **30** : 645-650

BATEY RG, JOHNSTON R. Effects of alcohol, carbon tetrachloride, and choline deficiency on iron metabolism in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 1993, **17** : 931-934

BAUTISTA AP, SPITZER JJ. Role of Kupffer cells in the ethanol-induced oxidative stress in the liver. *Front Biosci* 1999, **4** : D589-D595

BAUTISTA AP. Impact of alcohol on the ability of Kupffer cells to produce chemokines and its rôle in alcoholic liver disease. *J Gastro Hepatol* 2000, **15** : 349-356

BEGIN Y, BERGAMASCHI G, HUEBERS HA, FINCH CA. The behavior of asialotransferrin-iron in the rat. *Am J Hematol* 1988, **29** : 204-210

BELL H, BJORNEBOE A, EIDSVOLL B, NORUM KR, RAKNERUD N et coll. Reduced concentration of hepatic alpha-tocopherol in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Alcohol Alcohol* 1992, **27** : 39-46

BJORNEBOE A, BJORNEBOE GE. Antioxidant status and alcohol-related disease. *Alcohol Alcohol* 1993, **28** : 111-116

BROOKS PJ. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity - a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1997, **6** : 1073-1082

BUETTNER GR. The pecking order of free radicals and antioxidants : lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993, **300** : 535-543

CABALLERIA J, GIMENEZ A, ANDREU H, DEULOFEU R, PARES A et coll. Zinc administration improves gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism of ethanol in alcohol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1997, **21** : 1619-1622

CABRÉ M, FOLCH J, GIMEREZ A, MATAS C, PARES A et coll. Influence of zinc intake on hepatic lipid peroxidation and metallothioneins in alcoholic rats : Relationship to collagen synthesis. *Int J Vit Nutr Res* 1995, **65** : 45-50

CALABRESE V, RANDAZZO G, RAGUSA N, RIZZA V. Long-term ethanol administration enhances age-dependent modulation of redox state in central and peripheral organs of rat : protection by metadoxine. *Drugs Exptl Clin Res* 1998, **XXIV** : 85-91

CHAPMAN RW, MORGAN MY, BELL R, SHERLOCK S. Hepatic iron uptake in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1983, **84** : 143-147

CLOT P, TABONE M, ARICO S, ALBANO E. Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. *Gut* 1994, **35** : 1637-1643

CLOT P, ALBANO E, ELIASSON E, TABONE M, ARICO S et coll. Cytochrome P4502E1 hydroxyethyl radical adducts as the major antigen in autoantibody formation among alcoholics. *Gastroenterology* 1996, **111** : 206-216

COLANTONI A, LA PAGLIA N, DE MARIA N, EMANUELE MA, EMANUELE NV et coll. Influence of sex hormonal status on alcohol-induced oxidative injury in male and female rat liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2000, **24** : 1467-1473

- CONDE-MARTEL A, GONZALEZ-REIMERS E, SANTOLARIA-FERNANDEZ F, CASTRO-ALEMAN V, GALINDO-MARTIN L et coll. Combined effects of ethanol and protein deficiency on hepatic iron, zinc, manganese, and copper contents. *Alcohol* 1992, **9** : 341-348
- DAVIES KJA, GOLDBERG AL. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J Biol Chem* 1987, **262** : 8227-8234
- DEAN RT, HUNT JV, GRANT AJ, YAMAMOTO Y, NIKI E. Free radical damage to proteins : the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. *Free Rad Biol Med* 1991, **11** : 161-168
- DIETER P, SCHULZE-SPECKING A, DECKER K. Differential inhibition of prostaglandin and superoxide production by dexamethazone in primary cultures of rat Kupffer cells. *Eur J Biochem* 1986, **159** : 451-457
- FANG JL, VACA C. Development of a ^{32}P postlabelling method for the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate. *Carcinogenesis* 1995, **16** : 2177-2185
- FARINATI F, CARDIN R, DE MARIA N, LECIS PE, DELLA LIBERA G et coll. Zinc, iron, and peroxidation in liver tissue. *Biol Trace Element Res* 1995, **47** : 193-199
- FATACCIOLI V, ANDRAUD E, GENTIL M, FRENCH S, ROUACH H. Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities : relationship with oxidative stress. *Hepatology* 1999, **29** : 14-20
- FERNANDEZ-CHECA JC, GARCIA-RUYZ C, OOKHTENS M, KAPLOWITZ N. Impaired uptake of GSH by hepatic mitochondria from chronic alcohol-fed rats. Tracer kinetic studies in vitro and in vivo and susceptibility to oxidant stress. *J Clin Invest* 1991, **87** : 397-405
- FERNANDEZ-CHECA JC, KAPLOWITZ N, GARCIA-RUYZ C, COLELL A, MIRANDA M et coll. SH transport in mitochondria : Defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol* 1997, **273** : G7-G17
- FRENCH SW, WONG K, JUI L, ALBANO E, HAGBJORK AL, INGELMAN-SUNDBERG M. Effect of ethanol on cytochrome P-450 (CYP2E1), lipid peroxidation and serum protein adduct formation in relation to liver pathology pathogenesis. *Exp Mol Pathol* 1993, **58** : 61-75
- FRIEDMAN SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. *New Engl J Med* 1993, **328** : 1828-1835
- FROMENTY B, GRIMBERT S, MANSOURI A, BEAUGRAND M, ERLINGER S et coll. Hepatic mitochondrial DNA deletion in alcoholics : association microvesicular steatosis. *Gastroenterology* 1995, **108** : 193-200
- GARCIA-RUYZ C, MORALES A, BALLESTA A, RODES J, KAPLOWITZ N, FERNANDEZ-CHECA JC. Effect of chronic alcohol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1994, **94** : 193-201
- GARCIA-RUYZ C, MORALES A, COLLELL A, BALLESTA A, RODES J et coll. Feeding S-adenosyl-L-methionine attenuates both ethanol-induced depletion of mitochondrial glutathione and mitochondrial dysfunction in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Hepatology* 1995, **21** : 134-141

GONZALEZ-REIMERS E, SANTOLARIA-FERNANDEZ F, PEREZ-LABAJOS J, RODRIGUEZ-MORENO F et coll. Relative and combined effects of propylthiouracil, ethanol and protein deficiency on liver histology and hepatic iron, zinc, manganese and copper contents. *Alcohol Alcoholism* 1996, **31** : 535-545

GRATTAGLIANO I, VENDEMIALE G, DIDONNA D, ERRICO F, BOLOGNINO A et coll. Oxidative modification of proteins in chronic alcoholics. *J Biol Res* 1995, **71** : 189-195

GRATTAGLIANO I, VENDEMIALE G, SABBA C, BUONAMICO P, ALTOMARE E. Oxidation of circulating proteins in alcoholics : role of acetaldehyde and xanthine oxidase. *J Hepatol* 1996, **25** : 28-36

HALLIWELL B, GUTTERIDGE J. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine : some problems and concept. *Arch Biochem Biophys* 1986, **246** : 501-504

HARMAN D. Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956, **11** : 298-300

HENNET B, RICHTER C, PETERHANS E. Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *Biochem J* 1993, **289** : 587-592

HOUZÉ P, ROUACH H, GENTIL M, ORFANELLI MT, NORDMANN R. Effect of allopurinol on the hepatic and cerebellar iron, selenium, zinc and copper status following acute ethanol administration to rats. *Free Rad Res Comms* 1991, **12-13** : 663-668

ISHII H, THURMAN R, INGELMAN-SUNDBERG M, CEDERBAUM A, FERNANDEZ-CHECA J et coll. Oxidative stress in alcoholic liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 1996, **20** : 162A-167A

KAMIMURA S, GAAL K, BRITTON RS, BACON BR, TRIADAFILOPOULOS G, TSUKAMOTO H. Increased 4-hydroxynonenal levels in experimental alcoholic liver disease : association of lipid peroxidation with liver fibrogenesis. *Hepatology* 1992, **16** : 448-453

KAMIMURA S, TSUKAMOTO H. Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology* 1995, **21** : 1304-1309

KAWASE T, KATO S, LIEBER CS. Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 1989, **10** : 815-821

KLASSEN LW, THIELE GM. Immune reactivity to proteins biotransformed by alcohol metabolites. *Alcohol Clin Exp Res* 1998, **22** : S204-207

KNECHT KT, ADACHI Y, BRADFORD BU, LIMURO Y, KADIISKA M et coll. Free radical adducts in the bile of rats treated chronically with intragastric alcohol : inhibition by destruction of Kupffer cells. *Molec Pharmacol* 1995, **47** : 1028-1034

KONO H, RUSYN I, YIN M, GABELE E, YAMASHINA S, DIKALOVA A et coll. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000, **106** : 867-872

KUKIELKA E, DICKER E, CEDERBAUM AI. Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment. *Arch Biochem Biophys* 1994, **309** : 377-386

KUMAGAI T, KAWAMOTO Y, NAKAMURA Y, HATAYAMA I, SATOH K et coll. 4-hydroxy-2-nonenal, the end product of lipid peroxidation, is a specific inducer of cyclooxygenase-2 gene expression. *Biochem Biophys Res Com* 2000, **273** : 437-441

- LANDS WEM. Cellular signals in alcohol-induced liver injury : a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1995, **19** : 928-938
- LETTERON P, DUCHATELLE V, BERSON A, FROMENTY B, FISH C et coll. Increased ethane exhalation, an in vivo index of lipid peroxidation, in alcohol-abusers. *Gut* 1993, **34** : 409-414
- LIEBER CS, DE CARLI LM. Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. In vitro characteristics and adaptative properties in vivo. *J Biol Chem* 1970, **245** : 2504-2512
- LIEBER CS, ROBINS SJ, DE CARLI LM, MAK KM, FASSILO JM et coll. Phosphatidylcholine protects against fibrosis and cirrhosis in baboon. *Gastroenterology* 1994, **106** : 152-159
- LIEBER CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol* 1997, **38** : 601-628
- LIOCHEV SI, FRIDOVICH I. How does superoxide dismutase protect against tumor necrosis factor : a hypothesis informed by effect of superoxide on « free » iron. *Free Rad Biol Med* 1997, **23** : 668-671
- MANSOURI A, FROMENTY B, BERSON A, ROBIN MA, GRIMBERT S et coll. Multiple hepatic DNA deletions suggest premature oxidative aging in alcoholics. *J Hepatol* 1997, **27** : 96-102
- MARSHALL JB, BURNETT DA, ZETTERMAN RK, SORRELL MF. Clinical and biochemical courses of alcoholic liver disease following sudden discontinuation of alcoholic consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 1983, **7** : 312-315
- DE LA MAZA MP, PETERMANN M, BUNOUT D, HIRSCH S. Effects of long-term vitamin E supplementation in alcoholic cirrhotics. *J Am Coll Nutr* 1995, **14** : 192-196
- MEAGHER EA, BARRY OP, BURKE A, LUCEY MR, LAWSON JA et coll. Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J Clin Invest* 1999, **104** : 805-813
- MILMAN N, LAURSEN J, PODENPHANT J, ASNAES S. Trace elements in normal and cirrhotic human liver tissue I. Iron, copper, zinc, selenium, manganese, titanium and lead measured by X-ray fluorescence spectrometry. *Liver* 1986, **6** : 111-117
- MUTLU-TÜRKOGLU U, DOGRU-ABBASOGLU S, AYKAC-TOKER G, MIRSAL H, BEAZYÜREK M, UYSAL M. Increased lipid and protein oxidation and DNA damage in patients with chronic alcoholism. *J Lab Clin Med* 2000, **136** : 287-291
- NANJI AA, KHWAJA S, TAHAN SR, SADRZADEH HSM. Plasma levels of a novel noncylooxygenase-derived prostanoid (8-isoprostane) correlate with severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. *J Pharmacol Exp Ther* 1994a, **269** : 1280-1285
- NANJI AA, ZHAO S, SADRZADEH SMH, DANNENBERG AJ, TAHAN SR, WAXMAN DJ. Markedly enhanced cytochrome P450 2E1 induction and lipid peroxidation is associated with severe liver injury in fish oil-ethanol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1994b, **18** : 1280-1285
- NANJI AA, GRINIUVIENE B, SADRZADEH SMH, LEVITSKY S, MCCULLY JD. Effect of type of dietary fat and ethanol on antioxidant enzyme mRNA induction in rat liver. *J Lipid Res* 1995a, **36** : 736-744

NANJI AA, GRINUVIENE B, YACOUB LK, SADRZADEH SMH, LEVITSKY S, MCCULLY JD. Heat-shock gene expression in alcoholic liver disease in the rat is related to the severity of liver injury and lipid peroxidation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995b, **210** : 12-19

NANJI AA, MIAO L, THOMAS P, RAHEMTULA A, KHWAJA S et coll. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat. *Gastroenterology* 1997, **112** : 943-951

NAVASUMRIT P, WARD TH, DODD NJE, O'CONNOR PJ. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented *in vivo* by antioxidants : effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis* 2000, **21** : 93-99

NIEMELÄ O, PARKKILA S, YLÄ-HERTTUALA S, HALSTED C, WITZTUM JL et coll. Covalent protein adducts in the liver as a result of ethanol metabolism and lipid peroxidation. *Lab Invest* 1994, **70** : 537-546

NIEMELÄ O, PARKKILA S, JUVONEN RO, VIITALA K, GELBOIN HV, PASANEN M. Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2000, **33** : 893-901

NORDMANN R, ROUACH H, HOUZE P. Alcool, fer et stress oxydatif. *Bull Acad Natl Med* 1990, **174** : 95-104

NORDMANN R, RIBIERE C, ROUACH H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Rad Biol Med* 1992, **12** : 219 -240

ODELEYE OE, ESKELSON CD, WATSON RR, MUTTI SI, EARNEST D, CHVAPIL M. Effect of ethanol consumption and vitamin E supplementation on *in vivo* lipid peroxidation in rats. *Nutrition Res* 1991, **11** : 1177-1186

PERTOFT H, SMEDSRÖD B. Separation and characterization of liver cells. In : Cell separation : methods and applications. PRETLOWII TG, PRETLOW TP, eds. Academic Press, New York, USA, 1987, **4** : 1-24

POMPELLA A, ROMANI A, BENEDETTI A, COMPORTI M. Loss of membrane protein thiols and lipid peroxidation in allyl alcohol hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1991, **41** : 1255-1259

POTTER BJ. Alcohol and hepatic iron homeostasis. In : Drug Alcohol Abuse. WATSON RR, ed. Reviews Liver Pathology and Alcohol. The Humana Press Inc ; 1991, **2** : 1-60.

PUNTARULO S, CEDERBAUM AI. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med* 1998, **24** : 1324-1330

REGOECZI E, CHINDEMI PA, DEBANNE MT. Transferrin glycans : a possible link between alcoholism and hepatic siderosis. *Alcohol Clin Exp Res* 1984, **8** : 287-292

REINKE LA, LAI EK, DU BOSE CM, MAC CAY PB. reactive free radical generation in vivo in heart and liver of ethanol-fed rats : correlation with radical formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, **84** : 9223-9227

REINKE LA, MOORE DR, MCCAY PB. Free radical formation in livers of rat treated acutely and chronically with alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 1997, **21** : 642-646

REMMER H, KESSLER W, EINSELE H, HINTZE TH, DIAZ DE TORANZO G et coll. Ethanol promotes oxygen-radical attack on proteins but not on lipids. *Drug Metab Rev* 1989, **20** : 219-232

RODRIGUEZ-MORENO F, GONZALEZ-REIMERS E, SANTOLARIA-FERNANDEZ F, GALINDO-MARTIN L et coll. Zinc, copper, manganese, and iron in chronic alcoholic liver disease. *Alcohol* 1997, **14** : 39-44

ROUACH H, PARK MK, ORFANELLI MT, JANVIER B, BRISSOT P, BOURREL M et coll. Effects of ethanol on hepatic and cerebellar lipid peroxidation and endogenous antioxidants in naive and chronic iron overloaded rats. In : *Alcohol Toxicity and Free Radical Mechanisms*. NORDMANN R, RIBIÈRE C, ROUACH H, eds. (Advances in the Biosciences, vol. 71). Oxford : Pergamon Press, 1988 : 49-54

ROUACH H, HOUZÉ P, ORFANELLI MT, GENTIL M, BOURDON R, NORDMANN R. Effects of acute ethanol administration on the subcellular distribution of iron in rat liver and cerebellum. *Biochem Pharmacol* 1990, **39** : 1095-1100

ROUACH H, HOUZÉ P, GENTIL M, ORFANELLI MT, NORDMANN R. Effects of acute ethanol administration on the uptake of ⁵⁹Fe-labeled transferrin by rat liver and cerebellum. *Biochem Pharmacol* 1994, **47** : 1835-1841

ROUACH H, FATACCIOLI V, GENTIL M, FRENCH SW, MORIMOTO M, NORDMANN R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 1997, **25** : 351-355

ROUACH H. Éléments traces, stress oxydant et hépatopathies alcooliques. *Nutr Clin Metabol* 1999, **13** : 218-224

SAGARA Y, DARGUSCH R, CHAMBERS D, DAVIS J, SCHUBERT D, MAHER P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1998, **24** : 1375-1389

SERGEANT O, MOREL I, COGREL P, CHEVANNE M, PASDELOUP N, BRISSOT P et coll. Increase in cellular pool of low-molecular-weight iron during ethanol metabolism in rat hepatocyte cultures. *Biol Trace Element Res* 1995, **47** : 185-192

SHAHBAZIAN LM, WOOD S, WATSON RR. Ethanol consumption and early murine retrovirus infection influence liver, heart, and muscle levels of iron, zinc, and copper in C57BL/6 mice. *Alcohol Clin Exp Res* 1994, **18** : 964-968

SHAW S, JAYATILLEKE E, LIEBER CS. Lipid peroxidation as a mechanism of alcoholic liver injury : role of iron mobilization and microsomal induction. *Alcohol* 1988, **5** : 135-140

SINACEUR J, RIBIÈRE C, SABOURAULT D, NORDMANN R. Superoxide formation in liver mitochondria during ethanol intoxication : possible role in alcohol hepatotoxicity. In : *Free radicals in liver injury*. POLI G, CHEESEMAN KH, DIANZANI MU, SLATER TF, eds. IRL Press, Oxford, 1985 : 175-177

TAKEYAMA Y, KAMIMURA S, KUROIWA A, SOHDA T, IRIE M et coll. Role of Kupffer cell-derived reactive oxygen intermediates in alcoholic liver disease in rats *in vivo*. *Alcohol Clin Exp Res* 1996, **20** : 335A-339A

THOMAS CE, MOREHOUSE LA, AUST SD. Ferritin and superoxide dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1985, **260** : 3275-3280

- TSUKAMOTO H, TOWNER SJ, CIOFALO LM, FRENCH SW. Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology* 1986, **6** : 814-822
- TSUKAMOTO H, HORNE W, KAMIMURA S, NIEMELÄ O, PARKKILA S et coll. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* 1995, **96** : 620-630
- TSUKAMOTO H, LIN M, OHATA M, GIULIVI C, FRENCH SW, BRITTENHAM G. Iron primes hepatic macrophages for NF- κ B activation in alcoholic liver injury. *Am J Physiol* 1999, **277** : G1240-G1250
- UCHIDA K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Rad Biol Med* 2000, **28** : 1685-1696
- VIITALA K, MAKKONEN K, ISRAEL Y, LEHTIMAKI T, JAAKKOLA O et coll. Autoimmune responses against oxidant stress and acetaldehyde-derived epitopes in human alcohol consumers. *Alcohol Clin Exp Res* 2000, **24** : 1103-1109
- WENZEL G, KUKLINSKI B, RUHLMANN C, EHRARDT D. Alcohol-induced toxic hepatitis. A « free radical » associated disease lowering fatality by adjuvant antioxidant therapy. *Z Gesamte Inn Med* 1993, **48** : 490-496
- WICKRAMASINGHE SN, HASAN R. *In vivo* effects of vitamin C on the cytotoxicity of post-ethanol serum. *Biochem Pharmacol* 1994, **48** : 621-624
- WIELAND P, LAUTERBURG BH. Oxidation of mitochondrial proteins and DNA following administration of ethanol. *Biochem Biophys Res Comm* 1995, **213** : 815-819
- YOKOHAMA H, NAGATA S, MORIYA S, KATO S, ITO K et coll. Hepatic fibrosis produced in guinea pigs by chronic ethanol administration and immunization with acetaldehyde adducts. *Hepatology* 1995, **21** : 1438-1442