

2

Enzymes du métabolisme de l'éthanol

La majeure partie de l'éthanol est oxydée au niveau de l'hépatocyte. Le métabolisme fait intervenir deux oxydations, la première transformant l'alcool en acétaldéhyde, la seconde l'acétaldéhyde en acétate (figure 2.1).

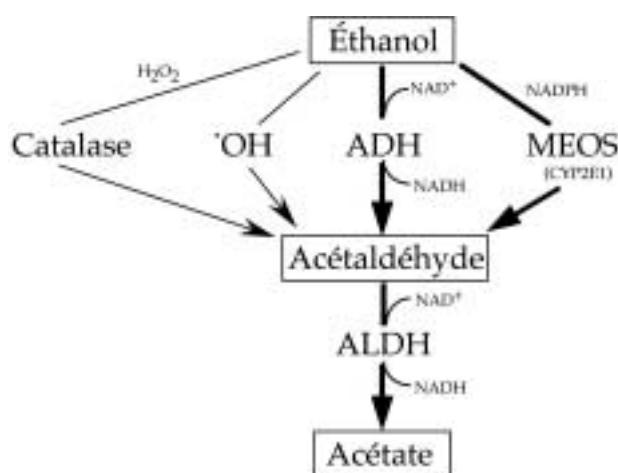


Figure 2.1 : Métabolisme hépatique de l'éthanol

ADH : alcool déshydrogénase ; ALDH : aldéhyde déshydrogénase ;
MEOS : voie microsomale ; CYP : cytochrome P450

L'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde se fait selon trois voies enzymatiques, chacune située dans un compartiment cellulaire différent. Les voies les mieux établies sont celles de l'alcool déshydrogénase (ADH), qui est cytosolique, et celle du système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS), qui fait intervenir le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) et qui est localisée dans le réticulum endoplasmique. La voie de l'ADH est prépondérante. La voie de la catalase, localisée dans les peroxysomes, semble peu importante, car la présence d'eau oxygénée, nécessaire à la réaction, est limitée dans l'organisme. Une partie de l'éthanol peut également être oxydée par une voie radicalaire,

résultant de l'attaque de l'éthanol par des radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) générés au cours du métabolisme de l'éthanol. Cette voie a plus récemment été décrite et son importance est encore mal connue. L'acétaldéhyde est ensuite oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), dont la localisation est cytosolique et mitochondriale. L'acétate est libéré en grande partie dans la circulation générale et oxydé en CO_2 et H_2O dans les tissus extrahépatiques. Seules sont reprises dans ce chapitre les principales enzymes du métabolisme de l'éthanol, l'ADH, le CYP2E1 et l'ALDH.

Alcool déshydrogénase

L'alcool déshydrogénase (ADH) est une enzyme cytosolique utilisant le NAD^+ comme cofacteur. C'est une protéine dimérique contenant deux atomes de zinc par sous-unité. Elle appartient à une famille polygénique dans laquelle on peut identifier, chez l'homme, 7 gènes (*ADH1* à *ADH7*) qui codent pour des sous-unités différentes.

Classification des ADH

Les sous-unités sont associées deux par deux pour former des isoenzymes, réparties dans cinq classes selon leurs propriétés électrophorétiques, enzymatiques et leurs similarités de séquence (tableau 2.1) (Bosron et Li, 1986 ; Ehrig et coll., 1990). La séquence en acides aminés complète de ces isoenzymes a été décrite (Jörnvall et coll., 1987). Il existe un polymorphisme génétique pour les loci *ADH2* et *ADH3*. Les allèles *ADH2*1*, *ADH2*2* et *ADH2*3* codent respectivement pour les sous-unités β_1 , β_2 et β_3 , les allèles *ADH3*1* et *ADH3*2* pour les sous-unités γ_1 et γ_2 . Généralement, les sous-unités identiques s'assemblent entre elles pour former des isoenzymes homodimériques ($\alpha\alpha$, $\beta_1\beta_1$...). Cependant, les sous-unités de la classe I peuvent se combiner pour former des hétérodimères ($\alpha\beta$...)

Les enzymes de classe I (ADH- α, β, γ) sont principalement présentes dans le foie et les glandes surrénales, mais également en plus faible quantité dans le rein, le poumon et d'autres tissus, excepté le cerveau et le cœur (pour revues Crabb, 1995 ; Edenberg, 2000). Elles ont une forte affinité pour l'éthanol (K_m ou constante de Michaelis bas : 0,05 – 4,4 mM), et jouent du fait de leur abondance dans le foie un rôle très important dans le métabolisme de l'alcool.

Les enzymes de classe II (ADH- π) ont été détectées dans le foie et le duodénum. Elles ont un K_m plus élevé pour l'éthanol (34 mM) mais sont très abondantes dans le foie, ce qui signifie qu'elles contribuent à l'oxydation de l'alcool pour des concentrations élevées.

Les enzymes de classe III (ADH- χ), relativement abondantes dans tous les tissus étudiés, y compris le cerveau, les leucocytes et l'estomac, seraient les

Tableau 2.1 : Classification des ADH

Classe	Gène	Allèle	Sous-unité	Km _{éthanol} [mM (g/l)]	Vmax (min ⁻¹)	Localisation tissulaire	
I	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	α	4,4 (0,2)	23	Foie	
		<i>ADH2</i>	<i>ADH2*1</i>	β1	0,05 (0,002)	9	Foie, poumons
			<i>ADH2*2</i>	β2	0,94 (0,04)	340	
	<i>ADH3</i>	<i>ADH3*1</i>	γ1	1,0 (0,05)	88	Foie, estomac	
			γ2	0,63 (0,029)	35		
		<i>ADH3*2</i>					
II	<i>ADH4</i>	<i>ADH4</i>	π	34,0 (1,56)	20	Foie	
III	<i>ADH5</i>	<i>ADH5</i>	χ	> 1 000 (46,0)		Tous tissus + cerveau	
IV	<i>ADH7</i>	<i>ADH7</i>	σ, μ	37,0 (1,7)	1 510	Œsophage, estomac	
V	<i>ADH6</i>	<i>ADH6</i>	?	?	?	Foie (ARNm)	

Les constantes cinétiques sont données pour des dimères. Km (constante de Michaelis) représente la concentration d'éthanol pour laquelle l'enzyme travaille à moitié de sa vitesse maximale. Vmax représente la vitesse maximale de l'activité enzymatique et est exprimée en mole de substrat métabolisée par minute et par mole d'enzyme. Les enzymes travaillent à leur vitesse maximale pour des concentrations d'environ 10 à 20 Km.

« ancêtres » de l'ADH. Elles métabolisent les alcools à longue chaîne et les acides gras ω-hydroxylés (Parès et Vallee, 1981) et sont également appelées formaldéhyde déshydrogénases glutathion-dépendantes (Koivusalo et coll., 1989). Elles ont un Km élevé pour l'éthanol, compatible avec les concentrations susceptibles d'être présentes au niveau de l'estomac. Elles pourraient de ce fait participer au « métabolisme de premier passage » de l'éthanol et expliquer les différences hommes/femmes à ce niveau, ces dernières ayant une activité ADH-χ plus faible que les hommes (Baraona et coll., 2001).

Les enzymes de classe IV (ADH-μ ou σ selon les auteurs) ont été découvertes plus récemment (Yin et coll., 1990 ; Moreno et Parès, 1991). Elles ont été purifiées à partir de l'estomac et de l'œsophage. Elles ont une faible affinité pour l'éthanol (Km 37 mM) mais une vitesse de métabolisation élevée. L'ADH-σ est habituellement présente chez les Caucasoïdes, mais absente ou très faiblement active chez la majorité des Asiatiques (Lieber, 2000). La contribution de l'ADH gastrique au métabolisme de premier passage de l'alcool fait actuellement l'objet de débats (Lieber, 2000). Elle semble cependant mineure et indépendante du sexe et de l'âge chez les Asiatiques (Yin et coll., 1999 ; Lai et coll., 2000). En outre, l'ADH-σ est très active sur le métabolisme du rétinol (Yin et coll., 1999 ; Ang et coll., 1996) qui est oxydé en rétinol, étape limitante dans la synthèse de l'acide rétinolique. L'acide rétinolique joue un rôle important dans le développement embryonnaire, la spermatogénèse et la différenciation épithéliale.

L'ADH de classe V, qui est le produit du gène *ADH6*, est mal caractérisée. L'*ADH6* a été cloné en criblant des bibliothèques d'ADN génomique et d'ADNc avec des oligonucléotides correspondant à certaines régions des

ADH (Yasunami et coll., 1991). L'ARN messenger de ce gène a été identifié dans le foie et l'estomac, mais l'enzyme elle-même n'a pas été purifiée.

Régulation de l'expression de l'ADH

Les isoenzymes de l'ADH constituent 1 % des protéines cytosoliques du foie et leur ARN messenger y est très abondant, indiquant que ces gènes sont très actifs dans le foie. La distribution de l'ADH dans les hépatocytes fait état d'une localisation périportale, périveineuse ou continue selon les études. Ces différences proviennent probablement du manque de spécificité des anticorps utilisés. Les quantités d'ADH diffèrent selon les sujets.

Les 7 gènes codant pour les isoenzymes de l'ADH sont situés sur le chromosome 4, dans une région contenant également les gènes de protéines spécifiques du foie (albumine, α -foetoprotéine, fibrinogène...). La régulation de ces gènes a fait l'objet d'une revue récente (Edenberg, 2000). La structure des gènes et la spécificité tissulaire des promoteurs ont été très étudiées. Les gènes de l'ADH ont environ 15 kb et 9 exons. Les promoteurs sont constitués d'une combinaison de sites de liaisons pour des facteurs de transcription ubiquitaires et pour des facteurs spécifiques de certains tissus. Les affinités de ces différents sites de liaison diffèrent entre les classes et pourraient expliquer l'activation des *ADH 1, 2, 3* au cours du développement foetal.

Des sites de liaison pour les hormones thyroïdiennes, l'acide rétinoïque et les glucocorticoïdes ont été décrits dans les régions « amont » des gènes de l'ADH. Ces hormones affectent l'activité des promoteurs *in vitro* : l'acide rétinoïque et les glucocorticoïdes activent la transcription, les hormones thyroïdiennes antagonisant l'effet de l'acide rétinoïque (Harding et Duester, 1992). Mais ces effets semblent nuls ou faibles *in vivo*. D'autres hormones ont été étudiées, mais moins en détail (Crabb, 1995). Chez l'animal, la régulation de l'ADH a été étudiée en mesurant le contenu hépatique en ADH ainsi que la vitesse d'élimination de l'alcool *in vivo*. Le jeûne, un régime hypocalorique ou une carence en zinc diminuent la vitesse d'élimination de l'alcool (Bosron et coll., 1984). Chez le rat, l'hormone de croissance augmente l'activité de l'ADH, alors que les androgènes et les hormones thyroïdiennes la diminuent. L'hypophysectomie, la thyroïdectomie et l'orchidectomie augmentent l'activité de l'ADH. Chez l'homme, le traitement par des androgènes diminue la vitesse d'élimination de l'alcool (Mezey et coll., 1988). Mishra et coll. (1989) ont montré que les femmes avaient des vitesses d'élimination d'alcool supérieures à celles des hommes. Cependant, dans d'autres études, aucune différence liée au sexe n'a été retrouvée au niveau de l'activité ADH hépatique ni de l'élimination de l'alcool. L'activité de l'ADH est diminuée chez les consommateurs excessifs et chroniques d'alcool et augmente après sevrage (Thomas et coll., 1982).

Polymorphisme génétique de l'ADH

Il existe un polymorphisme génétique pour les gènes *ADH2* et *ADH3* (Bosron et Li, 1986). Les allèles *ADH2*1*, *ADH2*2* et *ADH2*3* codent respectivement pour les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ (Arg/His 47) et $\beta 3$ (Arg/Cys 369). Bien que différant par un seul acide aminé, ces isoenzymes ont des propriétés catalytiques tout à fait distinctes *in vitro*, car la mutation affecte le site de fixation du NAD^+ sur l'enzyme. La forme $\beta 1$ a une faible activité (vitesse maximale (V_m) basse) mais une forte affinité pour l'éthanol (K_m bas), alors que les formes $\beta 2$ et $\beta 3$ ont une forte activité et une plus faible affinité, ce qui signifie que ces formes seront sollicitées pour des concentrations plus fortes d'alcool.

Les allèles *ADH3*1* et *ADH3*2* codent pour les sous-unités $\gamma 1$ et $\gamma 2$ (Arg/Gln 271 ; Ile/Val 349), les sous-unités $\gamma 1$ étant 2,5 fois plus actives que les sous-unités $\gamma 2$ pour une faible quantité d'alcool ingérée.

La fréquence des allèles codant pour l'ADH de la classe I diffère selon les ethnies (tableau 2.II).

Tableau 2.II : Fréquence (%) des allèles de l'ADH selon l'ethnie (d'après Bosron et Li, 1986)

	Fréquence (%)				
	<i>ADH 2*1</i>	<i>ADH 2*2</i>	<i>ADH 2*3</i>	<i>ADH 3*1</i>	<i>ADH 3*2</i>
Caucasoïdes américains	> 95	< 5	< 5	50	50
Caucasoïdes européens	85	< 15	< 5	60	40
Asiatiques (Japonais)	15	85	< 5	95	5
Afro-Américains	85	< 5	15	85	15

Chez les Caucasoïdes, l'*ADH2*1* est prédominant alors que c'est l'*ADH2*2* chez les Asiatiques. Les Caucasoïdes partagent à fréquence égale les *ADH3*1* et *ADH3*2* alors que l'allèle *ADH3*1* prédomine chez les sujets asiatiques ou afro-américains.

Influence de l'ADH et de ses polymorphismes sur le métabolisme et la consommation d'alcool

Toutes les isoenzymes de l'ADH montrent une cinétique de Michaelis-Menten vis-à-vis de l'éthanol et seules les isoenzymes $\gamma\gamma$ semblent avoir une coopérativité négative pour l'éthanol. L'ADH oxyde l'éthanol en acétaldéhyde selon un mécanisme « ping-pong » où le NAD^+ doit pénétrer dans son site de fixation avant que l'éthanol n'entre dans le domaine catalytique. La

quantité d'ADH est peu limitante dans le métabolisme de l'éthanol : l'oxydation de l'éthanol est en réalité contrôlée par la vitesse de réoxydation du NADH produit et par la quantité d'acétaldéhyde généré, qui peut être inhibiteur (Crabb et coll., 1983). Les taux de NADH sont contrôlés par l'activité des navettes permettant de transférer les équivalents réduits vers la mitochondrie et par l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Si la réduction de l'activité de l'ADH (rencontrée par exemple lors du jeûne) entraîne une diminution de la capacité d'oxydation de l'éthanol par le foie, l'oxydation de l'éthanol n'augmente pas de façon proportionnelle à l'augmentation de l'activité enzymatique. Ainsi, les sujets possédant les sous-unités β_3 , par exemple, n'ont une augmentation du métabolisme de l'alcool que de 20 % malgré des activités enzymatiques potentiellement très élevées (Thomasson et coll., 1995), suggérant que le taux de réoxydation du NADH est limitant. L'incapacité à accroître l'oxydation de l'acétaldéhyde qui s'accumule peut également limiter l'activité de l'ADH.

Les génotypes de l'ADH ont été associés à des différences de consommation d'alcool. Les sujets possédant un allèle *ADH2*2* (enzyme très active) ont un risque de consommation excessive d'alcool diminué. La prévalence de l'*ADH3*1* semble prédominante chez les sujets ne consommant pas excessivement de l'alcool, mais semble plus liée à la présence de l'allèle *ADH2*2* qu'à un effet propre. En effet, les allèles *ADH2*2* et *ADH3*1* sont voisins sur le chromosome et peuvent donc être transmis ensemble. Le fait que l'allèle *ADH2*2* soit « protecteur » contre la consommation excessive d'alcool a été retrouvé dans toutes les ethnies (Asiatiques, Maoris néo-zélandais ou Caucasoïdes) (Crabb, 1995 ; Li et coll., 2001 ; Borrás et coll., 2000).

Cytochrome P4502E1 (CYP2E1)

La deuxième voie d'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde la mieux établie est la voie microsomale ou MEOS (Lieber et de Carli, 1968) qui fait intervenir principalement le CYP2E1 (Koop et Coon, 1986). Cette enzyme appartient à la superfamille des cytochromes P450 qui utilisent le NADPH et l'oxygène comme cofacteurs. D'autres isoenzymes du P450, les CYP1A2 et CYP3A4, peuvent également contribuer au métabolisme de l'éthanol (Salmela et coll., 1998). Ces enzymes membranaires sont localisées principalement dans le réticulum endoplasmique. Le K_m du CYP2E1 pour l'éthanol est d'environ 10 mM (0,5 g/l). Des radicaux libres sont produits au cours du métabolisme de l'éthanol par le CYP2E1 (Eckström et Ingelman-Sundberg, 1989), notamment des radicaux hydroxyles ($\bullet OH$) qui vont participer à l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde et à la formation de radicaux hydroxyéthyles (Albano et coll., 1999) impliqués dans la toxicité de l'éthanol. Le CYP2E1 possède également la capacité d'oxyder l'acétaldéhyde en acétate et son affinité pour l'acétaldéhyde est environ 1 000 fois plus grande que pour l'éthanol (Terelius et coll., 1991 ; Bell-Parikh et Guengerich, 1999). Le CYP2E1

catalyse de façon spécifique le métabolisme de nombreuses molécules, plus de 100 substrats étant connus à l'heure actuelle (tableau 2.III).

Tableau 2.III : Principaux substrats, inducteurs et inhibiteurs du CYP2E1

Substrats	Inducteurs	Inhibiteurs
Benzène	Diméthylsulfoxyde	Chlorméthiazole
Acétone	Acétone	Diallylsulfide
Chloroforme	Pyrazole	Diethyldithiocarbamate
Acétonitrile	Benzène	Disulfiram
Dapsone	Isopropanol	Malotilate
Aniline	Éthanol	4-Méthylpyrazole
Chlorure de vinyle	Isoniazide	Phénéthylisothiocyanate
Chlorzoxazone	Pyridine	
Enflurane	Trichloréthylène	
Éthanol		
Ether	Diabète	
Glycérol	Jeûne	
Halothane	Obésité	
Nitrosamines		
Paracétamol		
Phénol		
p-nitrophénol		
Pyrazole		
Pyridine		
Styrène		
Tétrachlorure de carbone		

Parmi ces molécules, certaines sont des substrats endogènes (acétone, acides gras), d'autres proviennent de l'alimentation (éthanol, nitrosamines...), d'autres sont des médicaments (anesthésiques, paracétamol, chlorzoxazone...) ou des solvants organiques industriels (benzène, trichloréthylène, styrène...). La chlorzoxazone, médicament myorelaxant utilisé couramment aux États-Unis, est un excellent substrat pour le CYP2E1. Elle peut être utilisée aussi bien *in vitro* (Peter et coll., 1990) qu'*in vivo* (Lucas et coll., 1999) pour mesurer l'activité de l'enzyme. Il a été très récemment montré que l'acide rétinoïque était également un substrat pour le CYP2E1. Son métabolisme par le CYP2E1 entraîne une diminution des récepteurs à l'acide rétinoïque impliqués dans la transduction du signal rétinoïde. Ceci peut avoir des répercussions sur la prolifération cellulaire et la transformation maligne (Liu et coll., 2001).

Régulation de l'expression du CYP2E1

Le CYP2E1 est exprimé en grande quantité au niveau de l'hépatocyte, et en quantité 10 à 100 fois plus faible dans les cellules de Kupffer (Koivisto et coll., 1996) et les tissus extrahépatiques (poumons, œsophage, intestin, cerveau, lymphocytes...) (pour revue Lieber, 1999). La répartition du CYP2E1 dans les hépatocytes n'est pas homogène. Les plus grandes concentrations sont retrouvées dans la région périveineuse du lobule hépatique (Lindros et coll., 1990), là où l'induction par l'éthanol et la toxicité sont le plus prononcées.

Chez le rat, l'activation du gène codant pour le CYP2E1 a lieu un jour après la naissance (Ueno et Gonzales, 1990). Le CYP2E1 augmente jusqu'à l'âge adulte et reste ensuite stable au cours de la vie, mais la variabilité interindividuelle des taux de CYP2E1 est grande chez l'homme et résulte probablement des différentes inductions dues à des facteurs environnementaux (Le Marchand et coll., 1999). La régulation hormonale du CYP2E1 a été essentiellement étudiée chez l'animal et dans divers modèles expérimentaux cellulaires (Lieber, 1999).

À la différence de la voie de l'ADH, la voie microsomale du CYP2E1 est inductible par l'alcool. Cette induction est observée soit à la suite de l'administration d'une seule dose forte d'éthanol (4 g/kg chez le rat) (Petersen et coll., 1982), soit au cours de l'alcoolisation chronique (Roberts et coll., 1994 ; Mishin et coll., 1998 ; Lucas et coll., 1995a) ; elle est potentialisée chez l'animal par l'association de l'alcoolisation avec une diète enrichie en acides gras insaturés (Takahashi et coll., 1992). L'induction du CYP2E1 par l'alcool peut se faire selon deux mécanismes :

- stabilisation de l'enzyme par son substrat, résultant d'une diminution de la dégradation de l'enzyme. Chez le rat, la demi-vie de la protéine ainsi stabilisée serait de 37 heures au lieu de 7 heures pour la protéine constitutionnelle (Roberts et coll., 1995) ;
- activation transcriptionnelle du gène pour des fortes concentrations d'alcool (Badger et coll., 1993).

L'induction du CYP2E1 concerne aussi bien les tissus hépatiques qu'extrahépatiques (Roberts et coll., 1994 ; Montoliu et coll., 1995). Chez l'homme, Takahashi et coll. (1993) ont montré que l'alcoolisation chronique induisait le CYP2E1 dans la zone périveineuse du lobule hépatique et était accompagnée d'une augmentation de l'ARNm corrélée avec la quantité de protéine. Après arrêt de l'intoxication alcoolique, le taux de CYP2E1 diminue rapidement pour retrouver le taux de base en 5 jours environ (Perrot et coll., 1989 ; Lucas et coll., 1995b ; Mishin et coll., 1998).

Certains solvants (acétone, benzène), médicaments (isoniazide) et conditions physiopathologiques (jeûne, diabète ou obésité) sont également des inducteurs du CYP2E1 (tableau 2.III). Un régime alimentaire dépourvu de méthionine et de choline provoque chez le rat une stéatohépatite associée à une induction du CYP2E1 (Weltman et coll., 1996). Cette induction du CYP2E1

se retrouve également chez l'homme atteint de stéatohépatite d'origine non alcoolique (Weltman et coll., 1998).

Le mécanisme d'induction du CYP2E1 varie selon l'inducteur (tableau 2.IV). Il est complexe et peut intervenir à différents niveaux : transcriptionnel, prétraductionnel, traductionnel et post-traductionnel (pour revue Koop et Tierney, 1990).

Tableau 2.IV : Mécanismes d'induction du CYP2E1

Inducteur	Niveau de régulation
Naissance, jeûne, alcoolisation chronique	Transcription
Diabète	Stabilisation de l'ARN messenger
Isoniazide	Efficacité de la traduction
Éthanol, imidazole, isoniazide, acétone	Stabilisation de l'enzyme

À l'inverse, on connaît également des inhibiteurs du CYP2E1 (tableau 2.III), dont certains sont des médicaments (chlorméthiazole, disulfiram, malotilate), alors que d'autres, tels que le diallylsulfide (ail) ou le phénéthylthiocyanate (crucifères) se trouvent dans l'alimentation.

Polymorphisme génétique du CYP2E1

Le gène du CYP2E1 est situé sur le chromosome 10. Il se compose d'environ 11 kb et 9 exons (Song et coll., 1986). Plusieurs polymorphismes génétiques ont été décrits pour le CYP2E1 chez l'homme (Nedelcheva et coll., 1996), mais aucun polymorphisme important n'affecte la partie codante du gène (Itoga et coll., 1999). Deux sites ont été plus particulièrement étudiés :

- le site de restriction *Rsa I*, en complet déséquilibre de liaison avec le site *Pst I* (Hayashi et coll., 1991), est situé dans la partie 5'-régulatrice du gène. Il permet de caractériser les allèles c1 (commun) et c2 (muté). Cette mutation augmente le taux de transcription *in vitro* d'un gène *reporter*, mais des résultats contradictoires concernant l'expression ou l'activité de l'enzyme ont été obtenus *in vivo* : dans certaines études, la présence de l'allèle muté est associée à une activité transcriptionnelle augmentée (Watanabe et coll., 1994), alors que, dans d'autres études, aucune différence d'expression ou d'activité n'a été retrouvée (Carrière et coll., 1996 ; Powell et coll., 1998). À l'inverse, certaines études ont montré que l'allèle muté était plutôt associé à une diminution de l'activité de la protéine (Le Marchand et coll., 1999) ou de son inductibilité (Lucas et coll., 1995b) ;
- le site de restriction *Dra I*, situé dans l'intron 6, est partiellement lié au site *Rsa I* et permet de caractériser les allèles D et C (Hirvonen et coll., 1993).

La fréquence des allèles mutés du *CYP2E1* diffère selon les ethnies (tableau 2.V). Elle est relativement faible chez les Caucasoïdes (2 % à 8 %) comparativement aux Asiatiques (20 % à 28 %).

Tableau 2.V : Fréquence (%) des allèles rares *c2 (RsaI)* et *C (DraI)* et *CYP2E1*1D* (répétition) en fonction de l'ethnie

Auteurs	Ethnie	Fréquence (%)		
		<i>c2 (RsaI)</i>	<i>C (DraI)</i>	<i>CYP2E1*1D</i>
Lucas et coll., 1996 ; Plee-Gautier et coll., 2001 ; Mc Carver et coll., 1998	Caucasoïdes	2,5	7,9	1,5 à 6,9
Stephens et coll., 1994 ; Hu et coll., 1999	Asiatiques	28,0	24,0	20,0
Lucas, présentation personnelle	Indiens d'Amérique	12,0	17,0	-
Stephens et coll., 1994 ; Mc Carver et coll., 1998	Afro-Américains	1,0	8,0	20,0

En raison du rôle joué par le *CYP2E1* dans le développement des hépatopathies et dans l'activation de procarcinogènes, une association de ces deux polymorphismes avec les maladies hépatiques dues à l'alcool ou avec différents types de cancer a été recherchée dans de nombreuses études (méta-analyse Wong et coll., 2000). Des résultats contradictoires ont été obtenus, ce qui laisse penser que ces allèles mutés ne sont pas des facteurs de risque importants dans la survenue de ces maladies.

Récemment, un polymorphisme de répétition, situé dans la partie 5'-régulatrice du gène, a été décrit (Mc Carver et coll., 1998 ; Hu et coll., 1999). L'allèle *CYP2E1*1D* serait associé à une augmentation de l'inductibilité du gène sous l'influence de l'alcool ou de l'obésité. Cependant, ces premiers résultats demandent à être confirmés dans des populations où la fréquence de ce polymorphisme est importante (Asiatiques et Afro-Américains), car une étude menée chez des Caucasoïdes n'a pas permis de démontrer de façon claire une différence d'activité chez des hétérozygotes (Plee-Gautier et coll., 2001).

Influence du *CYP2E1* et de ses polymorphismes génétiques sur le métabolisme et la consommation d'alcool

Les contributions respectives des différents systèmes enzymatiques responsables du métabolisme de l'alcool ne sont pas clairement définies. Il semble que le *CYP2E1* soit responsable d'environ 10 % du métabolisme de l'éthanol à l'état non induit. Le taux de *CYP2E1* est multiplié par 5 à 10 chez les consommateurs excessifs d'alcool, mais la vitesse d'élimination de l'alcool n'est augmentée que de 10 % à 20 % (Lands, 1998).

En ce qui concerne les polymorphismes génétiques du *CYP2E1*, aucune étude n'a pu établir une relation claire entre le génotype et l'activité enzymatique du

CYP2E1 ou entre le génotype et la vitesse d'élimination de l'alcool (Ueno et coll., 1996 ; Yoshihara et coll., 2000). Ceci rend probablement compte des multiples facteurs environnementaux influençant le métabolisme de l'alcool. Le polymorphisme génétique du *CYP2E1* n'a pas souvent été trouvé associé à une consommation excessive et chronique d'alcool. Seules deux études ont montré une fréquence accrue des allèles mutés C (polymorphisme *Dral*) chez les consommateurs excessifs (Iwahashi et coll., 1998 ; Lucas et coll., 1996).

Aldéhyde déshydrogénase

L'acétaldéhyde est oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Celle-ci appartient à une superfamille d'enzymes comprenant 16 gènes chez l'homme (Vasiliou et Pappa, 2000). Comme l'ADH, elle est NAD^+ dépendante (Smith, 1986). Ces enzymes ont une large spécificité de substrat pour les aldéhydes aromatiques et aliphatiques. Elles oxydent les aldéhydes en leur acide carboxylique correspondant. La réaction est thermodynamiquement irréversible dans les conditions physiologiques. Ces enzymes ont des constantes d'inhibition fortes pour le NADH à la différence de nombreuses déshydrogénases qui sont inhibées pendant le métabolisme de l'éthanol. Ainsi, les ALDH restent actives malgré l'augmentation du rapport NADH/NAD^+ qui a lieu au cours du métabolisme de l'éthanol (Crabb, 1995).

Les deux isoenzymes les plus importantes dans le métabolisme de l'éthanol sont l'ALDH1 et l'ALDH2 (ALDH1A1 et ALDH2 selon la nouvelle nomenclature recommandée, Vasiliou et coll., 1999), toutes deux homotétramériques (Smith, 1986). L'ALDH1, cytosolique, possède des variants responsables de différences de sensibilité à l'éthanol, même si la base moléculaire de ces différences n'est pas élucidée (Yoshida, 1992). Son K_m pour l'acétaldéhyde est de l'ordre de 50-100 μM et elle est sensible à l'inhibition *in vitro* par le disulfiram. Elle possède une forte affinité pour le rétinol ($K_m = 60 \text{ nM}$ à pH 7,5, (Yoshida et coll., 1992). L'ALDH2, mitochondriale, a une affinité pour l'acétaldéhyde beaucoup plus forte que l'ALDH1 ($K_m < 1 \mu\text{M}$) et est responsable de la majeure partie de l'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate. Elle est moins sensible à l'inhibition par le disulfiram. La mesure de l'activité ALDH dans le foie de sujets déficients pour l'ALDH2 suggère qu'environ 40 % de l'activité totale du foie est liée à l'ALDH2 et 60 % à l'ALDH1 ou aux autres isoformes (Crabb, 1995). L'activité de l'ALDH est également diminuée au cours de l'alcoolisme chronique (Lin et coll., 1984 ; Argawal et coll., 1987), mais remonte après quelques semaines de sevrage. Une autre ALDH a été détectée au niveau des mitochondries. Elle a été appelée ALDHx ou ALDH5 (ALDH1B1 selon la nouvelle nomenclature). Son K_m pour l'acétaldéhyde est égal à 30 μM , suggérant qu'elle pourrait jouer un rôle dans le métabolisme de l'éthanol (Stewart et coll., 1995).

Régulation de l'expression de l'ALDH

L'enzyme paraît être répartie de façon homogène dans l'acinus hépatique, avec une légère prédominance dans la zone périportale des hépatocytes, en accord avec une augmentation de la toxicité de l'acétaldéhyde dans la zone péricentrale (Chen et coll., 1992). Les ARN messagers des ALDH 1, 2 et 5 sont présents dans le foie (en grande quantité), mais également dans de très nombreux autres tissus : rein, muscle, cœur (en quantité relativement abondante) et placenta, cerveau, pancréas (en quantité plus faible), suggérant que ces tissus seront également des cibles privilégiées pour la toxicité par l'acétaldéhyde (Crabb, 1995). Le contrôle génétique de l'expression de l'ALDH est en cours d'étude. Le promoteur de l'ALDH2 contient un site de liaison pour un facteur de transcription ubiquitaire (Stewart et coll., 1996) qui joue probablement un rôle dans l'expression du gène à faible niveau dans la plupart des tissus. D'autres sites de liaison plus complexes ont également été identifiés en amont et seraient impliqués dans l'expression plus forte du gène au niveau du rein et du foie (Li et coll., 2001).

Polymorphisme génétique de l'ALDH

Plusieurs variants de l'ALDH1 existent chez l'homme, tous basés sur le métabolisme de l'éthanol (Yoshida, 1992). La nature de ces variants reste à déterminer sur le plan moléculaire. Un polymorphisme génétique a principalement été mis en évidence au niveau de l'ALDH2 : l'allèle *ALDH2*1* code pour une enzyme très active, présente chez tous les Caucasoïdes, alors que l'*ALDH2*2* code pour une enzyme inactive présente chez environ 50 % des Asiatiques (Goedde et coll., 1979). La mutation responsable correspond à la substitution d'une lysine par un acide glutamique à la position 487 du polypeptide, sur le site de fixation du coenzyme, entraînant une augmentation d'un facteur 100 du Km du NAD⁺, rendant l'enzyme inactive dans les conditions physiologiques (Crabb et coll., 1989). L'allèle commun est appelé *ALDH2*1* et l'allèle mutant *ALDH2*2*. Le déficit en ALDH2 est un trait dominant : les hétérozygotes comme les homozygotes présentent une activité enzymatique déficiente. La conséquence de cette ALDH inactive est une accumulation d'acétaldéhyde associée à un afflux de sang (« *flush* ») facial et à des signes d'intolérance à l'alcool (maux de tête, hypotension, tachycardie, faiblesse musculaire, brûlures épigastriques), semblables aux effets rencontrés lors de l'administration de disulfiram (effet « antabuse »). La fréquence élevée de l'*ALDH2*2* dans certaines populations pourrait résulter d'une sélection par leur résistance aux effets délétères de toxines alimentaires et de maladies infectieuses grâce à leur enzyme inactive (Goldman et Enoch, 1990).

Un nouveau polymorphisme a été décrit dans la partie 5'-régulatrice du gène de l'ALDH2 (Harada et coll., 1999 ; Chou et coll., 1999). Ce polymorphisme est commun chez les Asiatiques, les Afro-Américains et les Caucasoïdes (fréquences respectives de l'allèle A 0,17, 0,34, et 0,44) et pourrait affecter l'activité de l'enzyme ou sa régulation. Il est moins fréquent chez les Japonais

consommateurs excessifs que chez les non-consommateurs excessifs homozygotes pour l'ALDH2*1 (fréquence de l'allèle rare 0,016 *versus* 0,068). Une activité diminuée, suggérée par des expériences réalisées *in vitro*, pourrait engendrer des réactions d'aversion envers l'alcool et moduler le risque d'alcoolisme.

Des études récentes ont montré que l'ALDH5 est également polymorphique (Sherman et coll., 1993). Les études sur un nombre limité de sujets n'ont pas montré d'association entre les différents génotypes de l'ALDH5 et la consommation excessive d'alcool chez les Caucasoïdes.

Influence de l'ALDH et de ses polymorphismes génétiques sur le métabolisme et la consommation d'alcool

L'activité de l'ALDH n'est pas limitante dans le métabolisme de l'éthanol. On considère que tout l'acétaldéhyde généré par l'ADH est métabolisé par l'ALDH. Cependant, la situation change lorsque l'on est en présence d'individus ayant une ALDH2 déficiente. Chez ces individus, les concentrations d'acétaldéhyde sont très augmentées après ingestion d'alcool (Wall et coll., 1997) et on peut donc s'attendre à une inhibition de l'activité de l'ADH par l'acétaldéhyde. L'ALDH2*2 étant dominant, les hétérozygotes auront des activités enzymatiques intermédiaires entre celles des homozygotes ALDH2*1 et ALDH 2*2. Bien que les études sur l'effet de l'ALDH2 déficiente soient limitées à cause des effets néfastes observés, des taux d'élimination d'alcool diminués ont été observés chez ces sujets (Crabb, 1995). Les concentrations augmentées d'acétaldéhyde observées chez les consommateurs excessifs après ingestion d'alcool sont généralement associées à une augmentation, plutôt qu'à une diminution, de l'élimination de l'alcool, mais ceci reflète alors probablement l'induction du CYP2E1 qui oxyde à la fois l'éthanol en acétaldéhyde puis l'acétaldéhyde en acétate.

Il est maintenant établi que la présence de l'allèle ALDH2*2 protège fortement contre la consommation excessive d'alcool (Peterson et coll., 1999 ; Chen et coll., 1999a). En effet, une ALDH déficiente est associée à une réduction de la quantité et de la fréquence de l'ingestion d'alcool, l'accumulation d'acétaldéhyde dans le sang provoquant des réactions désagréables qui dissuadent de consommer. Les sujets homozygotes sont protégés d'une consommation excessive du fait de la sévérité de leur « *flush* », mais cette protection ne tient en réalité qu'à l'abstinence qu'elle entraîne. Il semble que cet effet protecteur diminue au fil du temps, du fait de changements environnementaux et culturels. En revanche, s'il y a consommation d'alcool, les taux d'acétaldéhyde plus élevés entraînent des risques plus grands de développer un cancer de l'œsophage ou du tractus aérodigestif (Yokoyama et coll., 1999). Il faut également souligner que les individus ayant une ALDH2 déficiente sont plus susceptibles à la toxicité de certains solvants industriels nécessitant une activité ALDH dans leur processus de détoxication, comme par exemple le 2-méthoxyéthanol (Kitagawa et coll., 2000).

Conséquences métaboliques et toxiques de l'oxydation de l'éthanol

De très nombreuses études ont montré que les principaux facteurs responsables de désordres métaboliques et de la toxicité de l'éthanol étaient l'augmentation du NADH, la production d'acétaldéhyde, la génération de radicaux libres et l'induction du CYP2E1 (Lieber, 1997b, 1999).

Augmentation du rapport NADH/NAD⁺

Dans le foie, la principale conséquence métabolique de l'oxydation de l'éthanol est l'augmentation du rapport NADH/NAD⁺ (NAD⁺ étant le coenzyme des ADH et ALDH), ce qui entraîne une perturbation du métabolisme des glucides et des lipides. Il existe ainsi une augmentation de la transformation des pyruvates en lactates, avec plusieurs conséquences : freinage de la néoglycogénèse à partir des pyruvates, favorisant l'hypoglycémie qui peut être induite également par d'autres mécanismes, hyperlactacidémie susceptible de conduire à une acidose ou à une hyperuricémie, ou de jouer un rôle dans les crampes musculaires, ou bien encore de favoriser la fibrose hépatique. On observe également une augmentation intrahépatique de L-glycérol-3-phosphate utilisé dans la synthèse des triglycérides, de même qu'une diminution du catabolisme des acides gras par inhibition de la (-oxydation, favorisant l'accumulation de triglycérides dans le foie (stéatose).

La poursuite de l'oxydation de l'éthanol rend nécessaire la réoxydation cytosolique du NADH en NAD⁺. Cette réoxydation implique la participation des mitochondries pour le transfert des équivalents réducteurs à travers la membrane mitochondriale, *via* des navettes dont la principale est la navette malate-aspartate.

Production d'acétaldéhyde

L'acétaldéhyde, métabolite très toxique car très réactif, est un intermédiaire obligatoire dans le métabolisme oxydatif de l'éthanol. Ce composé est capable de former des adduits aux molécules environnantes (protéines, enzymes, glutathion...). Ces adduits ont été retrouvés aussi bien au niveau du foie que du cerveau (Rintala et coll., 2000) : ils modifient les propriétés de certaines protéines (diminution de l'activité enzymatique, transformation en protéines antigéniques à l'origine de réactions immunologiques). Les adduits acétaldéhyde-protéine stimulent en outre la production de collagène. L'acétaldéhyde est par ailleurs particulièrement toxique pour la mitochondrie : il favorise la mort cellulaire en diminuant le glutathion réduit et en augmentant la peroxydation lipidique et les effets toxiques des radicaux libres. L'acétaldéhyde traverse le placenta, diminue la méthylation de l'ADN fœtal et peut contribuer au syndrome d'alcoolisation fœtale.

Ces réactions sont cependant limitées par le maintien de concentrations très basses en acétaldéhyde par l'ALDH. Après ingestion d'éthanol, la concentration circulante en acétaldéhyde est inférieure à 1 μM , grâce à l'ALDH dont le K_m pour l'acétaldéhyde est très bas, la vitesse de réaction étant supérieure à celle de la transformation d'éthanol en acétaldéhyde. Les concentrations d'aldéhyde circulantes sont augmentées chez les consommateurs excessifs chroniques.

Formation de radicaux libres

De nombreuses études ont mis en évidence la production de radicaux libres lors du métabolisme de l'éthanol. Ces radicaux libres sont à l'origine de la lipoperoxydation des membranes. Ils peuvent provenir de l'activité microsomale liée au CYP2E1, de la chaîne respiratoire mitochondriale, source physiologique de radicaux libres ou de l'oxydation de l'acétaldéhyde par la xanthine oxydase (Nordmann, 1994). Leur production est nettement liée à la présence de fer non lié à des protéines. Différents modèles expérimentaux ont montré un lien entre l'induction du CYP2E1, la peroxydation lipidique et la toxicité hépatique (Nanji et coll., 1994 ; Wu et Cederbaum, 2000).

L'utilisation d'inhibiteurs du CYP2E1 a permis de mettre en évidence le rôle de cette enzyme dans la peroxydation lipidique et la toxicité hépatique de l'alcool (Morimoto et coll., 1995). Cependant, les cellules de Kupffer semblent jouer un rôle important dans l'initiation de cette toxicité chez le rat (Koop et coll., 1997). Le métabolisme de l'éthanol par le CYP2E1 produit différentes sortes d'espèces radicalaires pouvant être impliquées dans la lipoperoxydation : anions superoxydes conduisant, en présence d'eau oxygénée et de fer, à la formation de radicaux hydroxyles très réactifs, et radicaux hydroxyéthyles provenant de l'attaque de l'éthanol par les radicaux hydroxyles, ou formés directement par le CYP2E1 (Albano et coll., 1999). Les radicaux hydroxyéthyles attaquent à leur tour les molécules environnantes et forment des adduits aux protéines (Clot et coll., 1996). Ceux-ci donnent naissance à des anticorps (Clot et coll., 1997) dont la quantité est corrélée à l'activité du CYP2E1 chez les consommateurs excessifs d'alcool (Dupont et coll., 1998). Des anticorps anti-CYP2E1 et anti-CYP3A ont également été mis en évidence chez des consommateurs excessifs d'alcool (Lytton et coll., 1999).

La production de radicaux libres par le CYP2E1 ne semble pas être le principal facteur responsable du stress oxydant observé en cas de consommation excessive d'alcool, l'activité du CYP2E1 et le taux de différents marqueurs du stress oxydant n'étant pas corrélés chez des patients consommateurs excessifs chroniques (Dupont et coll., 2000).

Induction du CYP2E1 et activation de certains xénobiotiques et procarcinogènes

Le CYP2E1 peut également, en dehors de toute consommation d'alcool, métaboliser un certain nombre de xénobiotiques (solvants industriels, médicaments, procarcinogènes (Guengerich et Shimada, 1991) conduisant à des métabolites parfois plus toxiques que leurs précurseurs (tableau 2.VI).

Tableau 2.VI : Principaux xénobiotiques activés par le CYP2E1 (d'après Koop et Tierney, 1990)

Substrat	Produit	Toxicité
Benzène/phénol	Phénol/hydroquinone	Leucémie
N-nitrosodiméthylamine	Ion méthyl carbonium	Tumeur hépatique
Paracétamol	Benzoquinone-imine	Toxicité hépatique
Tétrachlorure de carbone	Radical trichlorométhyle	Toxicité hépatique
Éthanol	Acétaldéhyde	Dommages hépatiques

Ainsi, à titre d'exemple, le paracétamol est métabolisé en un composé hépatotoxique, la N-acétyl-p-benzoquinone-imine (NAPQI) éliminé après conjugaison avec le glutathion (Park, 1996). Chez le consommateur chronique d'alcool, l'activité du CYP2E1 est augmentée et les réserves en glutathion diminuées, ce qui abaisse le seuil de toxicité de ce médicament. De même, les nitrosamines présentes dans l'environnement (aliments, boissons, fumée de cigarette) sont activées par le CYP2E1 en un carbocation génotoxique (Yoo et coll., 1988) responsable de la carcinogénicité de ces molécules. Il a été montré que l'alcool, inducteur du CYP2E1, potentialisait cette carcinogénicité.

En conclusion, des progrès considérables ont été effectués dans la compréhension du métabolisme de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par l'ADH et l'ALDH, même si les étapes limitantes de ces réactions demandent encore à être étudiées. L'importance des isoenzymes hépatiques sur la consommation d'alcool et sa toxicité doit être soulignée, le meilleur exemple étant l'ALDH : en effet, si une activité ALDH très basse a un effet dissuasif pour la consommation d'alcool et constitue donc un facteur protecteur contre une consommation excessive, elle est à l'inverse un facteur de risque pour la toxicité en cas de consommation d'alcool. Ces dernières années ont vu également s'intensifier les recherches sur une autre enzyme du métabolisme de l'éthanol, le CYP2E1, dont on essaie de préciser le rôle dans la toxicité de l'éthanol et le stress oxydant. Si la connaissance des mécanismes progresse grâce à différents modèles expérimentaux, l'expression et la régulation de cette enzyme chez l'homme sont encore mal connues. Le métabolisme non hépatique de l'éthanol (cerveau, estomac...) demande également à être mieux connu : même si ces tissus contribuent de façon peu significative à l'élimination de l'alcool, une

meilleure connaissance de ce métabolisme devrait aider à la compréhension de la toxicité de l'alcool dans ces tissus.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBANO E, FRENCH S, INGELMANN-SUNDBERG M. Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Frontiers in Bioscience* 1999, **4** : 533-540
- ANG HL, DELTOUR L, ZGOMBIC-KNIGHT M, WAGNER MA, DUESTER G. Expression patterns of class I and class IV alcohol dehydrogenase genes in developing epithelia suggest a role for alcohol dehydrogenase in local retinoic acid synthesis. *Alcohol Clin Exp Res* 1996, **20** : 1050-1064
- ARGAWAL DP, VOLKENS T, HAFER G, GOEDDE HW. Erythrocyte aldehyde dehydrogenase : studies of properties and change in acute and chronic alcohol intoxication. *Prog Clin Biol Res* 1987, **232** : 85-101
- BADGER TM, HUANG J, RONIS M, LUMPKIN CK. Induction of cytochrome P4502E1 during ethanol exposure occurs via transcription of the CYP2E1 gene when blood concentrations are high. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **190** : 780-785
- BARAONA E, ABITTAN CS, DOHMEN K, MORETTI M, POZZATO G et coll. Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001, **25** : 502-507
- BELL-PARIKH LC, GUENGERICH FP. Kinetics of cytochrome P450 2E1-catalyzed oxidation of ethanol to acetic acid via acetaldehyde. *J Biol Chem* 1999, **274** : 23833-23840
- BORRAS E, COUTELLE C, ROSELL A, FERNANDEZ-MUIXI F, BROCH M et coll. Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase in europeans : the ADH2*2 allele decreases the risk for alcoholism and is associated with ADH3*1. *Hepatology* 2000, **31** : 984-989
- BOSRON WF, CRABB DW, HOUSINGER TA, LI TK. Effect of fasting on the activity and turnover of rat liver alcohol dehydrogenase. *Alcohol Clin Exp Res* 1984, **8** : 196-200
- BOSRON WF, LI TK. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology* 1986, **6** : 502-510
- CARRIERE V, BERTHOU F, BAIRD S, BELLOC C, BEAUNE P, DE WAZIERS I. Human cytochrome P4502E1 : from genotype to phenotype. *Pharmacogenetics* 1996, **6** : 203-211
- CHEN L, SIDNER RA, LUMENG L. Distribution of alcohol dehydrogenase and the low Km form of aldehyde dehydrogenase in isolated perivenous and periportal hepatocytes in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1992, **16** : 23-29
- CHEN CC, LU RB, CHEN YC, WANG MF, CHANG YC, LI TK, YIN SJ. Interaction between the functional polymorphisms of the alcohol-metabolism genes in protection against alcoholism. *Am J Hum Genet* 1999a, **65** : 795-807
- CHEN YC, LU RB, PENG GS, WANG MF, WANG HK et coll. Alcohol metabolism and cardiovascular response in an alcoholic patient homozygous for the ALDH2*2 variant gene allele. *Alcohol Clin Exp Res* 1999b, **23** : 1853-1860

CHOU MY, STEWART MJ, CARR LG, ZHENG D, STEWART TR et coll. An A/G polymorphism in the promoter of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) : effects of the sequence variant on transcription factor binding and promoter strength. *Alcohol Clin Exp Res* 1999, **23** : 963-968

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

CLOT P, PAROLA M, BELLOMO G, DIANZANI U, CARINI R et coll. Plasma membrane hydroxyethyl radical adducts cause antibody-dependent cytotoxicity in rat hepatocytes exposed to alcohol. *Gastroenterology* 1997, **113** : 265-276

CRABB DW, BOSRON WF, LI TK. Steady-state kinetic properties of purified rat liver alcohol dehydrogenase : application to predicting alcohol elimination in vivo. *Arch Biochem Biophys* 1983, **224** : 299-309

CRABB DW, EDENBERG HJ, BOSRON WF, LI TK. Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2(2) allele is dominant. *J Clin Invest* 1989, **83** : 314-316

CRABB DW, EDENBERG HJ. Gene regulation of alcohol metabolizing enzymes. *Alcohol Clin Exp Res* 1996, **20** : 113A-116A

CRABB DW. Ethanol oxidizing enzymes : roles in alcohol metabolism and alcoholic liver disease. *Prog Liver Dis* 1995, **13** : 151-172

DUPONT I, BODENEZ P, BERTHOUS F, SIMON B, BARDOU LG, LUCAS D. Cytochrome P-450 2E1 activity and oxidative stress in alcoholic patients. *Alcohol Alcohol* 2000, **35** : 98-103

DUPONT I, LUCAS D, CLOT P, MENEZ C, ALBANO E. Cytochrome P4502E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics. *J Hepatol* 1998, **28** : 564-571

ECKSTRÖM G, INGELMAN-SUNDBERG M. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P450 (P450 IIE1). *Biochem Pharmacol* 1989, **38** : 1313-1319

EDENBERG HJ. Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2000, **64** : 295-341

EHRIG T, BOSRON WF, LI TK. Alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol Alcohol* 1990, **25** : 105-116

GOEDDE HW, HARADA S, ARGAWAL DP. Racial difference in alcohol sensitivity : a new hypothesis. *Human Genetics* 1979, **51** : 331-334

GOLDMAN D, ENOCH MA. Genetic epidemiology of ethanol metabolic enzymes : a role for selection. *World Rev Nutr Diet* 1990, **63** : 143-160

GUENGERICH FP, SHIMADA T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 1991, **4** : 391-407

HARADA S, OKUBO T, NAKAMURA T, FUJII C, NOMURA F et coll. A novel polymorphism (-357 G/A) of the ALDH gene : linkage disequilibrium and an association with alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 1999, **23** : 958-962

HARDING PP, DUESTER G. Retinoic acid activation and thyroid hormone repression of the human alcohol dehydrogenase gene ADH3. *J Biol Chem* 1992, **267** : 14145-14150

- HAYASHI S, WATANABE J, KAWAJIRI K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation. *J Biochem* 1991, **110** : 559-565
- HIRVONEN A, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, ANTILLA S, KARJALAINEN A, VAINIO H. The human CYP2E1 gene and lung cancer. *DraI* and *RsaI* restriction fragment length polymorphisms in a finnish study population. *Carcinogenesis* 1993, **14** : 85-88
- HU Y, HAKKOLA J, OSCARSON M, INGELMAN-SUNDBERG M. Structural and functional characterization of the 5'-flanking region of the rat and human cytochrome P450 2E1 genes : identification of a polymorphic repeat in the human gene. *Biophys Biochem Res Comm* 1999, **263** : 286-293
- ITOGA S, NOMURA F, HARADA S, TSUTSUMI M, TAKASE S, NAKAI T. Mutations in the exons and exon-intron junction regions of human cytochrome P-4502E1 gene and alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 1999, **23** : 13S-16S
- IWAHASHI K, AMENO K, KINOSHITA H, NAKAMURA K, MIYATAKE R et coll. CYP2E1, ALDH2 and ADH2 genotypes and blood ethanol elimination kinetics. *Clin Chim Acta* 1996, **255** : 85-87
- IWAHASHI K, AMENO S, AMENO K, OKADA N, KINOSHITA H et coll. Relationship between alcoholism and C/D polymorphism. *Neuropsychobiology* 1998, **38** : 218-221
- JÖRNVALL H, HEMPEL J, VALLE BERT. Structures of human aldehyde dehydrogenases. *Enzyme* 1987, **37** : 5-18
- KITAGAWA K, KAWAMOTO T, KUNUGITA N, TSUKIYAMA T, OKAMOTO K et coll. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde ; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse. *Febs Lett* 2000, **476** : 306-311
- KLOTZ U, AMMON E. Clinical and toxicological consequences of the inductive potential of ethanol. *Eur J Clin Pharmacol* 1998, **54** : 7-12
- KOIVISTO T, MISHIN VM, MAK KM, COHEN PA, LIEBER CS. Induction of cytochrome P-4502E1 by ethanol in rat Kupffer cells. *Alcohol Clin Exp Res* 1996, **20** : 207-212
- KOIVUSALO M, BAUMANN M, UOTILA L. Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Letters* 1989, **257** : 105-109
- KOOP DR, COON MJ. Ethanol oxidation and toxicity : role of alcohol-P450 oxygenase. *Alcohol Clin Exp Res* 1986, **10** : 44S-49S
- KOOP DR, KLOPFENSTEIN B, IIMURO Y, THURMAN RG. Gadolinium chloride blocks alcohol-dependent liver toxicity in rats treated chronically with intragastric alcohol despite the induction of CYP2E1. *Mol Pharmacol* 1997, **51** : 944-950
- KOOP DR, TIERNEY DJ. Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1. *Bioassays* 1990, **12** : 429-435
- KOOP DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J* 1992, **6** : 724-730
- LAI CL, CHAO YC, CHEN YC, LIAO CS, CHEN MC et coll. No sex and age influence on the expression pattern and activities of human gastric alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Alcohol Clin Exp Res* 2000, **24** : 1625-1632

- LANDS WE. A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol*, 1998, **15** : 147-160
- LE MARCHAND L, WILKINSON GR, WILKENS LR. Genetic and dietary predictors of CYP2E1 activity : a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev* 1999, **8** : 495-500
- LI TK, YIN SJ, CRABB DW, O'CONNOR S, RAMCHANDANI VA. Genetic and environmental influences on alcohol metabolism in humans. *Alcohol Clin Exp Res* 2001, **25** : 136-144
- LIEBER CS, DE CARLI LM. Ethanol oxidation by hepatic microsomes : adaptative increase after ethanol feeding. *Science* 1968, **162** : 917-918
- LIEBER CS. Cytochrome P-4502E1 : its physiological and pathological role. *Physiological Review* 1997a, **77** : 517-544
- LIEBER CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 1997b, **257** : 59-84
- LIEBER CS. Ethnic and gender differences in ethanol metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 2000, **24** : 417-418
- LIEBER CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS) : the first 30 years (1968-1998)-a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1999, **23** : 991-1007
- LIN CC, POTTER JJ, MEZEY E. Erythrocyte aldehyde dehydrogenase activity in alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 1984, **8** : 539-541
- LINDROS KO, CAI Y, PENTTILÄ K. Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 IIE1 in carbon tetrachloride-induced damage to centrilobular hepatocytes from ethanol-treated rats. *Hepatology*, 1990, **12** : 1092-1097
- LIU C, RUSSEL RM, SEITZ HK, WANG XD. Ethanol enhances retinoic acid metabolism into polar metabolites in rat liver via induction of cytochrome P4502E1. *Gastroenterology* 2001, **120** : 179-189
- LUCAS D, FERRARA R, GONZALEZ E, BODENEZ P, ALBORES A et coll. Chlorzoxazone, a selective probe for phenotyping CYP2E1 in humans. *Pharmacogenetics* 1999, **9** : 377-388
- LUCAS D, MENEZ C, FLOCH F, GOURLAOUEN Y, SPARFEL O et coll. Cytochromes P4502E1 and P4501A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract cancer in alcoholic Caucasians. *Alcohol Clin Exp Res* 1996, **20** : 1033-1037
- LUCAS D, MENEZ C, GIRRE C, BERTHOU F, BODENEZ P et coll. Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. *Pharmacogenetics* 1995b, **5** : 298-304
- LUCAS D, MENEZ C, GIRRE C, BODENEZ P, HISPARD E, MENEZ JF. Decrease in cytochrome P4502E1 as assessed by the rate of chlorzoxazone hydroxylation in alcoholics during the withdrawal phase. *Alcohol Clin Exp Res* 1995a, **19** : 362-366
- LYTTON SD, HELANDER A, ZHANG-GOULLON ZQ, STOKKELAND K, BORDONE R et coll. Autoantibodies against cytochromes P-4502E1 and P-4503A in alcoholics. *Mol Pharmacol* 1999, **55** : 223-233
- MC CARVER DG, BYUN R, HINES RN, HICHME M, WEGENEK W. A genetic polymorphism in the regulatory sequences of human CYP2E1 : Association with increased chlorzoxazone hydroxylation in the presence of obesity and ethanol intake. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **152** : 276-281

- MEZEY E, OESTERLING JE, POTTER JJ. Influence of male hormones on rates of ethanol elimination in man. *Hepatology* 1988, **8** : 742-744
- MISHIN VM, ROSMAN AS, BASU P, KESSOVA I, ONETA CM, LIEBERS CS. Chlorzoxazone pharmacokinetics as a marker of hepatic cytochrome P4502E1 in humans. *Am J Gastroenterol* 1998, **93** : 2154-2161
- MISHRA L, SHARMA S, POTTER JJ, MEZEY E. More rapide elimination of alcohol in women as compared with their male siblings. *Alcohol Clin Exp Res* 1989, **13** : 552-554
- MONTOLIU C, SANCHO-TELLO M, AZORIN I, BURGAL M, VALLES S et coll. Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J Neurochem* 1995, **65** : 2561-2570
- MORENO A, PARES X. Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach. *J Biochem* 1991, **266** : 1128-1133.
- MORIMOTO M, HAGBJORK AL, WAN HJ, FU PC, CLOT P et coll. Modulation of experimental alcohol-induced liver disease by cytochrome P4502E1 inhibitors. *Hepatology* 1995, **21** : 1611-1617.
- NANJI AA, ZHAO S, SADRZADEH SM, 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* 1994, **18** : 1280-1285
- NEDELICHEVA V, PERSSON I, JOHANSSON I, INGELMAN-SUNDBERG M. Genetic polymorphism of human cytochrome P450 2E1. *Methods Enzymol* 1996, **272** : 218-225
- NORDMANN R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol* 1994, **29** : 513-522
- PARÈS X, VALLEE BL. New human liver alcohol dehydrogenase forms with unique kinetic characteristics. *Biochem Biophys Res Commun* 1981, **98** : 122-130
- PARK BK. Induction of human drug-metabolizing enzymes. *Br J Clin Pharmacol* 1996, **41** : 477-491
- PERROT N, NALPAS B, YANG CS, BEAUNE PH. Modulation of cytochrome P450 isozymes in human liver by ethanol and drug intake. *Eur J Clin Investig* 1989, **19** : 549-555
- PETER R, BOLKER R, BEAUNE PH, IWASAKI M, GUENGERICH FP, YANG CS. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P450 IIE1. *Chem Res Toxicol* 1990, **3** : 566-573
- PETERSEN DR, ATKINSON N, HJELLE JJ. Increase in hepatic microsomal oxidation by a single dose of ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 1982, **221** : 275-281
- PETERSON RJ, GOLDMAN D, LONG JC. Effects of worldwide population subdivision on ALDH2 linkage disequilibrium. *Genome Res* 1999, **9** : 844-852
- PLÉE-GAUTIER E, FORESTO F, FERRARA R, BODENEZ P, SIMON B et coll. Genetic repeat polymorphism in the regulating region of CYP2E1 : frequency and relationship with enzymatic activity in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 2001, **25** : 800-804
- POWELL H, KITTERINGHAM NR, PIRMOHAMED M, SMITH DA, PARK BK. Expression of cytochrome P450 2E1 in human liver : assessment by mRNA, genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 1998, **8** : 411-421

RINTALA J, JAATINEN P, PARKILLA S, SARVIHARARJU M, KIIANMAA K et coll. Evidence of acetaldehyde adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol Alcohol* 2000, **35** : 458-463

ROBERTS BJ, SHOAF SE, SONG BJ. Rapid changes in cytochrome P4502E1 (CYP2E1) activity and other P450 isozymes following ethanol withdrawal in rats. *Biochem Pharmacol* 1995, **49** : 1665-1673

ROBERTS BJ, SHOAF SE, JEONG KS, SONG BJ. Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **205** : 1064-1071

SALMELA KS, KESSOVA IG, TSYRLOV IB, LIEBER CS. Respective roles of human cytochrome P450 2E1, 1A2 and 3A4 in the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Alcohol Clin Exp Res* 1998, **22** : 2125-2132

SHERMAN D, DAVE V, HSU LC, PETERS TJ, YOSHIDA A. Diverse polymorphism within a short coding region of the human aldehyde dehydrogenase-5 (ALDH5) gene. *Human Genet* 1993, **92** : 477-480

SINCLAIR J, JEFFERY E, WRIGHTON S, KOBSTRUBSKY, SZAKACS J et coll. Alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity- Role of CYP2E and CYP3A. *Biochem. Pharmacol.* 1998, **55** : 1557-1565

SMITH M. Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Adv Hum Genet* 1986, **15** : 249-290

SONG BJ, GELBOIN HV, PARK SS, YANG CS, GONZALES FJ. Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450. *J Biol Chem* 1986, **261** : 16689-16697

STEPHENS EA, TAYLOR JA, KAPLAN N, YANG C-S, HSIEH LL et coll. Ethnic variation in the CYP2E1 gene : polymorphism analysis of 695 Africans-Americans, European Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 1994, **4** : 185-192

STEWART MJ, DIPPLE KM, STEWART TR, CRABB DW. The role of nuclear factor NF- κ B/CP1 in the transcriptional regulation of the human aldehyde dehydrogenase 2-encoding gene. *Gene* 1996, **173** : 155-161

STEWART ML, MALEK K, XIAO Q, DIPPLE KM, CRABB DW. The novel aldehyde dehydrogenase gene, ALDH5 encodes an active aldehyde dehydrogenase enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **211** : 144-151

STONE CL, THOMASSON HR, BOSRON WF, LI TK. Purification and partial amino-acid sequence of a high activity human alcohol dehydrogenase. *Alcohol Clin Exp Res* 1993, **17** : 911-917

TAKAHASHI H, JOHANSSON I, FRENCH SW, INGELMAN-SUNDBERG M. Effects of dietary fat consumption on activities of the microsomal ethanol oxidizing system and ethanol-inducible cytochrome P450 in the liver of rats chronically fed ethanol. *Pharmacol Toxicol* 1992, **70** : 347-352

TAKAHASHI H, LASKER JM, ROSMAN AS, LIEBER CS. Induction of P4502E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA. *Hepatology* 1993, **17** : 236-245

TERELIUS Y, NORSTEN-HOOG C, CRONHOLM T, INGELMAN-SUNDBERG M. Acetaldehyde as an efficient substrate for ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1). *Biochem Biophys Res Commun* 1991, **179** : 689-694

THOMAS M, HALSALL J, PETERS JJ. Role of hepatic acetaldehyde dehydrogenase in alcoholism : demonstration of persistent reduction of cytosolic activity in abstaining patients. *Lancet* 1982, **2** : 1057-1059

THOMASSON HR, BEARD JD, LI TK. *ADH2* gene polymorphisms are determinants of alcohol pharmacokinetics. *Alcohol Clin Exp Res* 1995, **19** : 1494-1499

TSUTSUMI M, LASKER JM, SHIMIZU M, ROSMAN AS, LIEBER CS. The intralobular distribution of ethanol-inducible P-450 IIE1 in rat and human liver. *Hepatology* 1989, **10** : 437-446

UENO T, GONZALES FJ. Transcriptional control of the hepatic CYP2E1 gene. *Mol Cell Biol* 1990, **10** : 4495-4505

UENO Y, ADACHI J, IMAMICHI H, NISHIMURA A, TATSUNO Y. Effect of cytochrome P4502E1 genotype on ethanol elimination rate in alcoholics and control subjects. *Alcohol Clin Exp Res* 1996, **20** : 17A-21A

VASILIOU V, BAIROCH A, TIPTON KF, NEBERT DW. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes : human polymorphisms and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics*, 1999, **9** : 421-434

VASILIOU V, PAPPA A. Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology* 2000, **61** : 192-198

WALL TL, PETERSON CM, PETERSON KP, JOHNSON ML, THOMASSON HR et coll. Alcohol metabolism in Asian-American men with genetic polymorphisms of aldehyde dehydrogenase. *Ann Intern Med* 1997, **127** : 376-379

WATANABE J, HAYASHI S, KAWAJIRI KJ. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the *RsaI* polymorphism in the 5'-flanking region. *J Biochem (Tokyo)* 1994, **116** : 321-326

WELTMAN MD, FARRELL GC, HALL P, INGELMAN-SUNDBERG M, LIDDLE C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998, **27** : 128-133

WELTMAN MD, FARRELL GC, LIDDLE C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996, **111** : 1645-1653

WONG NA, RAE F, SIMPSON KJ, MURRAY GD, HARRISON DJ. Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population : a study and literature review, including meta-analysis. *Mol Pathol* 2000, **53** : 88-93

WU D, CEDERBAUM AI. Ethanol and arachidonic acid produce toxicity in hepatocytes from pyrazole-treated rats with high levels of CYP2E1. *Mol Cell Biochem* 2000, **204** : 157-167

YASUNAMI M, CHEN CS, YOSHIDA A. A human alcohol dehydrogenase gene (*ADH6*) encoding an additional class of isozyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, **88** : 7610-7614

YIN SJ, HAN CL, LEE AI, WU CW. Human alcohol dehydrogenase family. Functional classification, ethanol/retinol metabolism, and medical implications. *Adv Exp Med Biol* 1999, **463** : 265-274

YIN SJ, WANG ME, LIAO CS, CHEN CM, WU CW. Identification of a human stomach alcohol dehydrogenase with distinctive kinetic properties. *Biochem Int* 1990, **22** : 829-835

YOKOYAMA A, MURAMATSU T, OMORI T, MATSUSHITA S, YOSHIMIZU H et coll. Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms influence susceptibility to oesophageal cancer in Japanese alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1999, **23** : 1705-1710

YOO JSH, GUENGERICH FP, YANG CS. Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Cancer Res* 1988, **48** : 1499-1504.

YOSHIDA A, HSU LC, DAVE V. Retinal oxidation activity and biological role of human cytosolic aldehyde dehydrogenase. *Enzyme* 1992, **46** : 239

YOSHIDA A. Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase. *Pharmacogenetics* 1992, **2** : 139-147

YOSHIHARA E, AMENO K, NAKAMURA K, AMENO M, ITOH S et coll. The effects of the ALDH2*1/2, CYP2E1 c1/c2 and C/D genotypes on blood ethanol elimination. *Drug Chem Toxicol* 2000, **23** : 371-379