



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I
2000

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 14 janvier 2000

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ – NANCY I**

Mention Sciences du Médicament

par

Nadège TERRIER

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

*Métabolisme et Mécanisme d'Action des Médicaments
Pharmacologie Clinique*

Sujet :

**Réactivité de métabolites d'acides carboxyliques (acylglucuronides, acyl CoA)
avec les UDP-glucuronosyltransférases.
Etude mécanistique et implications pharmacologiques.**

MEMBRES DU JURY

- Juges : Monsieur le Professeur Philippe Beaune
 Monsieur le Professeur Patrick Netter
 Madame le Docteur Sylvie Fournel-Gigleux (Chargée de Recherche INSERM)
 Monsieur le Docteur Jacques Magdalou (Directeur de Recherche CNRS)
- Rapporteurs : Monsieur le Professeur André Guillouzo
 Monsieur le Docteur Hervé Goudonnet
- Invités : Madame le Professeur Anna Radomska-Pandya
 Monsieur le Professeur Etienne Benoît

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

B 18968

Doyen : C. FINANCE
Vice Doyen : A. ROVEL

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
Mlle BESSON Suzanne
Mlle GIRARD Thérèse
M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

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

BU PHARM. ODONTOL.



D 104 047837 3

MAITRES DE CONFERENCES

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

ASSISTANTS

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

PROFESSEUR ASSOCIE

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

PROFESSEUR AGREGÉ

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

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires suivants :

Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires

UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré Nancy 1

(Directeur Pr. Patrick Netter)

Faculté de Médecine

Avenue de la Forêt de Haye

Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Laboratoire de Méthodologie et Synthèse Enantiospécifique de Biomolécules

UMR 7565 CNRS-Université Henri Poincaré Nancy 1

(Directeur Pr. Jean-Louis Rivail)

Faculté des Sciences

Vandoeuvre-lès-Nancy, France

(Dr. Yves Chapleur, Dr. Françoise Chrétien)

Laboratoire de Toxicologie et Métabolisme Comparés des Xénobiotiques

Unité Associée INRA-Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

(Directeur Pr. Paul Delatour)

Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

1, avenue Bourgelat

Marcy l'Etoile, France

(Pr. Etienne Benoît)

Gastroenterology Division

University of Arkansas for Medical Sciences

(Directeur Pr. Jean-Pierre Raufman)

4301, West Markham

Little Rock, AR, USA

(Pr. Anna Radomska-Pandya)

Ce travail a bénéficié du soutien financier

du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie

du Ministère des Affaires Etrangères

du Centre National de la Recherche Scientifique et de l'Université Henri Poincaré Nancy 1

de la Région Lorraine

de l'Association pour la Recherche sur la Polyarthrite

du National Institute of Health (DK49715)

REMERCIEMENTS

A Messieurs le Professeur André Guillouzo et le Docteur Hervé Goudonnet, qui ont accepté la charge d'évaluer cette thèse en qualité de rapporteurs. Qu'ils acceptent mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Professeur Philippe Beaune, qui a accepté de juger ce travail et de participer à ce jury. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Patrick Netter, qui m'a accueillie au laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A Madame le Professeur Anna Radomska-Pandya, qui a bien voulu faire parti de ce jury. Je lui adresse par ailleurs mes plus sincères remerciements pour son accueil particulièrement chaleureux à Little Rock. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Etienne Benoît, qui a accepté de participer à ce jury. Je lui adresse mes plus vifs remerciements pour l'intérêt constant qu'il a porté à mon travail et pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé à chacune de mes visites à Lyon. Qu'il soit assuré de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier par ailleurs la conviviale équipe lyonnaise pour sa sympathique collaboration.

A Monsieur le Docteur Jacques Magdalou, qui fut l'instigateur de ce travail. Qu'il accepte mes plus vifs remerciements pour m'avoir accueillie dans son équipe, et pour m'avoir toujours soutenue et encouragée tout au long de ces quelques années. Je lui témoigne mon profond respect et ma plus sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Sylvie Fournel-Gigleux, qui fut plus qu'impliquée dans ce travail. Je tiens à la remercier pour sa grande disponibilité et la qualité de ses conseils. Qu'elle trouve ici l'assurance de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Yves Chapleur et à Madame le Docteur Françoise Chrétien, qui m'ont ouvert leur laboratoire. Je les remercie pour leur participation à mes travaux de synthèse chimique.

A Monsieur le Professeur Jean-Charles Monier, Madame le Docteur Nicole Fabien et Madame Agnès Desbos, qui ont porté intérêt à ce travail. Je leur fait part de mes sincères remerciements pour leur fructueuse et prometteuse collaboration.

A Madame le Docteur Régine Herber, je lui adresse mes plus sincères remerciements pour m'avoir formée et conseillée à mon arrivée en DEA.

A Monsieur le Docteur Eric Battaglia, qui m'a donné l'envie de me lancer dans cette expérience. Je lui fait part de toute ma reconnaissance pour son aide et ses conseils avisés. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère amitié.

Je remercie Mademoiselle le Docteur Claire Senay et Monsieur le Docteur Mohamed Ouzzine d'avoir développé les outils de biologie moléculaire si précieux pour cette étude. Je remercie également Nicolas Levoin d'avoir synthétisé le kétoprofényl Coenzyme A et Madame le Docteur Nathalie Presle pour sa disponibilité et son esprit critique.

Je remercie mes amis de Little Rock, de Lyon, de la Faculté des Sciences de Nancy, de m'avoir toujours si gentiment ouvert leurs portes.

Merci à tous mes amis du Laboratoire de Pharmacologie d'avoir partagé le lot quotidien des thésards.

A mes parents

Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes la récompense de leur incommensurable soutien tout au
long de ces années

A mon frère Alex, au delà de nos différences...

A toute ma famille

A tous mes amis

Sommaire



TABLE DES MATIERES

Chapitre 1. Situation du sujet.....	16
I. La glucuronoconjugaison et les UGT.....	19
I.1. Mécanisme réactionnel de la glucuronoconjugaison.....	19
I.2. Les UGT.....	19
I.2.1. Nomenclature et classification des UGT.....	19
I.2.2. Propriétés générales des UGT.....	24
I.2.3. Domaines structuraux et organisation membranaire des UGT.....	25
I.2.4. Etudes mécanistiques et structurales des UGT.....	28
I.2.4.1. Modification chimique des protéines.....	29
I.2.4.2. Marqueurs d'affinité.....	30
II. Métabolisme des acides carboxyliques.....	34
II.1. Acides carboxyliques exogènes : les AINS.....	34
II.1.1. Propriétés physicochimiques, pharmacologiques et pharmacocinétiques des AINS.....	34
II.1.2. Métabolisme des AINS.....	40
II.1.2.1. Oxydation.....	40
II.1.2.2. Inversion chirale.....	40
II.1.2.2.1. Mécanisme de l'inversion chirale.....	40
II.1.2.2.2. Conséquences pharmacologiques et toxicologiques de l'inversion chirale.....	42
II.1.2.3. Glucuronoconjugaison.....	43
II.2. Métabolisme des acides carboxyliques endogènes.....	43
II.2.1. Acide rétinoïque tout- <i>trans</i>	43
II.2.2. Acide lithocholique.....	44
II.2.3. Acides gras.....	47
II.3. Isoformes d'UGT impliquées dans la glucuronoconjugaison des acides carboxyliques.....	47
III. Propriétés des glucuronides.....	49
III.1. Glucuronides pharmacologiquement actifs.....	51
III.2. Réactivité des acylglucuronides.....	53
III.2.1. Dégradation.....	53
III.2.1.1. Hydrolyse.....	53
III.2.1.2. Réarrangements intramoléculaires (acylmigration).....	55
III.2.1.3. Conséquences pharmacologiques de la dégradation des acylglucuronides.....	56
III.2.2. Fixation irréversible sur les protéines : formation d'adduits.....	56
III.2.2.1. Mécanismes de la formation des adduits.....	56
III.2.2.2. Cibles protéiques de la formation d'adduits.....	57
III.2.2.3. Conséquences de la formation d'adduits.....	59
III.2.2.3.1. Toxicité induite par modification des protéines.....	63
III.2.2.3.2. Hypothèse des haptènes.....	63
III.2.2.3.3. Cas des hépatites aux AINS.....	65

III.2.2.3.4. Réactions anaphylactoïdes.....	66
Chapitre 2. Présentation de l'étude et objectifs du travail.....	68
Chapitre 3. Matériel et méthodes.....	74
I. Matériel.....	74
I.1. Réactifs biochimiques.....	74
I.2. Réactifs de biologie cellulaire et moléculaire.....	74
I.3. Réactifs chimiques.....	74
II. Préparation des fractions protéiques.....	75
II.1. Microsomes hépatiques.....	75
II.1.1. Microsomes hépatiques humains.....	75
II.1.2. Microsomes hépatiques de rat.....	75
II.2. UGT recombinantes.....	75
II.2.1. Etablissement des lignées stables dans les cellules V79 et HK293.....	75
II.2.1.1. Lignées V79-UGT1A6, V79-UGT2B1 et HK293-UGT2B7.....	75
II.2.1.2. Lignée V79-UGT2B7.....	76
II.2.2. Conditions de culture des lignées cellulaires.....	76
II.2.3. Préparation des fractions membranaires.....	76
II.3. CRABP.....	76
II.4. Dosage protéique.....	77
III. Méthodes de dosage de la glucuronoconjugaison.....	77
III.1. Dosage des glucuronoconjugués par CLHP en phase inverse couplée à la spectrophotométrie.....	77
III.1.1. 1- et 2-Naphtol.....	77
III.1.2. Kétoprofène.....	79
III.2. Dosage des glucuronoconjugués par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence.....	79
III.2.1. 1-Naphtol.....	79
III.2.2. 4MO.....	80
III.3. Dosage des glucuronoconjugués par CCM couplée à la radiodétection.....	80
III.3.1. Aglycones radiomarqués.....	80
III.3.2. [¹⁴ C]UDPGA.....	81
III.4. Dosage de la glucuronoconjugaison <i>in situ</i>	81
IV. Western blot et immunofluorescence.....	82
IV.1. Anticorps et sérums.....	82
IV.1.1. Anticorps anti-UGT.....	82
IV.1.2. Anticorps anti-kétoprofène.....	82
IV.1.3. Sérums.....	82
IV.2. Western blot.....	82

IV.3. Immunofluorescence.....	83
V. Marquage d'affinité	84
V.1. Marqueur d'affinité <i>o</i> -UDPGA.....	84
V.2. Sonde [β - ³² P]5N ₃ UDPGA.....	84
V.3. Sonde [³ H]acide rétinoïque.....	85
VI. Synthèse des acylglucuronides.....	85
VI.1. Glucuronide de kétoprofène.....	85
VI.1.1. Synthèse enzymatique.....	85
VI.1.2. Synthèse chimique.....	86
VI.1.3. Identification et caractérisation du 1- <i>O</i> -acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène	88
VI.2. Glucuronide d'acide rétinoïque tout- <i>trans</i>	88
VI.3. Glucuronide d'acide lithocholique.....	88
VII. Etude de la réactivité des acylglucuronides avec les UGT.....	89
VII.1. Glucuronide de kétoprofène	89
VII.1.1. Inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison <i>in vitro</i>	89
VII.1.2. Identification des protéines adduites par Western blot	89
VII.1.3. Purification d'UGT adduites.....	91
VII.1.4. Marquage de photo-affinité des UGT adduites avec la sonde [β - ³² P]5N ₃ UDPGA.....	91
VII.1.5. Formation d'adduits <i>in situ</i>	93
VII.1.5.1. Inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison <i>in situ</i> dans les cellules en culture.....	93
VII.1.5.2. Identification des protéines adduites <i>in situ</i> par immunofluorescence.....	93
VII.2. Acides gras, acyl CoA et kétoprofényle CoA.....	93
VII.2.1. Inhibition réversible par les acides gras et leurs acyl CoA correspondants	93
VII.2.2. Inhibition irréversible par le palmitoyl CoA et le kétoprofényle CoA.....	94
VII.3. Acide rétinoïque tout- <i>trans</i> et acide lithocholique	94
VII.3.1. Inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison <i>in vitro</i>	94
VII.3.2. Marquage de photo-affinité des UGT modifiées par le glucuronide d'acide lithocholique avec la sonde [β - ³² P]5N ₃ UDPGA.....	94
VII.4. Détermination des paramètres cinétiques des inhibitions par les acylglucuronides	95
VIII. Marquage de photo-affinité des CRABP avec la sonde [³H]acide rétinoïque	95
IX. Modification des UGT par des agents chimiques	96
IX.1. Modification par les agents spécifiques des acides aminés carboxyliques.....	96
IX.2. Modification par les agents spécifiques des cystéines.....	96
IX. 3. Détermination des paramètres cinétiques des inactivations par les agents chimiques.....	96
X. Mutagenèse dirigée	98
 Chapitre 4. Résultats et Discussion.....	 99
I. Réactivité des acylglucuronides.....	99
I.1. Synthèse de glucuronide de kétoprofène.....	99

I.1.1. Principe de la synthèse enzymatique.....	99
I.1.2. Principe de la synthèse chimique	100
I.1.3. Identification et analyse structurale du 1- <i>O</i> -acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène synthétisé.....	101
I.1.4. Avantages et inconvénients des méthodes de synthèse.....	104
I.2. Réactivité de métabolites d'acides carboxyliques exogènes	108
I.2.1. Interaction de l'acylglucuronide de kétoprofène avec les UGT (<i>publication 1</i>).....	108
I.2.2. Interaction du kétoprofényl CoA avec les UGT.....	110
I.3. Réactivité de métabolites d'acides carboxyliques endogènes	114
I.3.1. Interaction des acylglucuronides d'acide rétinolique tout- <i>trans</i> et d'acide lithocholique avec les UGT et les CRABP (<i>publication 2</i>).....	114
I.3.1.1. Interaction des acylglucuronides d'acide rétinolique tout- <i>trans</i> et d'acide lithocholique avec les UGT	114
I.3.1.2. Interaction de l'acylglucuronide d'acide rétinolique tout- <i>trans</i> avec les CRABP	116
I.3.2. Interaction des acyl CoA d'acides gras avec les UGT.....	118
I.3.2.1. Inhibition de la glucuronoconjugaison par les acides gras et leurs dérivés activés acyl CoA.....	118
I.3.2.2. Mécanisme de l'inhibition de la glucuronoconjugaison par les acyl CoA : inhibition réversible ou irréversible par acylation ?.....	118
I.4. Recherche d'auto-anticorps dirigés contre les UGT chez des patients atteints d'hépatites virales.....	124
I.5. Discussion générale.....	126
I.5.1. Mécanismes impliqués dans la formation d'adduits par le glucuronide de kétoprofène	126
I.5.2. Identification des UGT comme cibles protéiques intracellulaires du glucuronide de kétoprofène	129
I.5.3. Identification du site de fixation du glucuronide de kétoprofène sur les UGT.....	131
I.5.4. Investigation des acides aminés impliqués dans la fixation covalente du glucuronide de kétoprofène sur les UGT	132
I.5.5. Analyse des cinétiques d'inhibition par les métabolites d'acides carboxyliques	134
I.5.6. Formation d'adduits <i>in vitro/in situ/in vivo</i>	135
I.5.7. Conséquences de la formation d'adduits sur les UGT	137
II. Etude de la structure et de la fonction des UGT impliquées dans la formation d'acylglucuronides.....	139
II.1. Clonage et expression stable de l'UGT2B7 dans les cellules V79.....	139
II.1.1. Résultats.....	139
II.1.2. Comparaison de la spécificité de substrat des UGT2B7 et UGT2B1	139
II.2. Développement de stratégies d'étude de l'organisation du site actif des UGT : cas de l'UGT1A6 humaine.....	149
II.2.1. Développement et utilisation d'un marqueur d'affinité : l' <i>o</i> -UDPGA (<i>publication 3</i>).....	149

II.2.2. Utilisation de la modification chimique et de la mutagenèse dirigée (<i>publication 4</i>).....	151
II.3. Application des stratégies développées à l'étude de l'organisation du site actif de l'UGT2B7 humaine (<i>publication 5</i>)	152
Chapitre 5. Conclusion et perspectives.....	154
Références bibliographiques.....	157

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Implications pharmacologiques et toxicologiques et fonctions physiologiques des UGT.	17
Figure 2. Synthèse de l'UDPGA.	20
Figure 3. Principe de la réaction de glucuronoconjugaison.	20
Tableau 1. Les 47 gènes <i>UGT</i> de mammifères actuellement clonés.	22
Figure 4. Organisation du gène <i>UGT1</i> humain.	23
Figure 5. Représentation des principaux domaines structuraux des UGT.	26
Figure 6. Représentation de l'organisation membranaire des UGT dans le RE.	26
Figure 7. Mécanisme réactionnel hypothétique de la glucuronoconjugaison de la 4MO par l'UGT1A6.	31
Figure 8. Marqueur d'affinité et sondes photo-activables.	33
Figure 9. Structure chimique d'acides carboxyliques à l'origine de la formation d'acylglucuronides.	35
Tableau 2. Classification chimique des AINS.	37
Figure 10. Enantiomères du kétoprofène.	39
Figure 11. Mécanisme d'inversion chirale des profènes.	41
Figure 12. Principales voies métaboliques de l'acide rétinoïque tout- <i>trans</i> chez l'homme.	45
Figure 13. Métabolisme de l'acide lithocholique.	46
Tableau 3. Isoformes d'UGT impliquées dans la conjugaison des acides carboxyliques.	48
Tableau 4. Fonctions chimiques pouvant être glucuronoconjuguées.	50
Figure 14. Structure chimique de la morphine et de la codéine.	52
Figure 15. Réactivité des acylglucuronides.	54
Figure 16. Mécanisme de stabilisation des adduits formés par base de Schiff.	58
Tableau 5. Protéines tissulaires cibles de la fixation covalente d'acylglucuronides.	60
Tableau 6. Principaux auto-anticorps dirigés contre des P450 et des UGT caractérisés chez des patients atteints d'hépatites.	62
Figure 17. Mécanismes proposés pour expliquer les effets secondaires liés à la formation des adduits.	64
Figure 18. Mécanismes hypothétiques de l'hépatotoxicité à médiation immune induite par la formation d'adduits.	67
Tableau 7. Choix des substrats et des techniques analytiques de dosage pour évaluer la glucuronoconjugaison catalysée par différentes sources d'UGT.	78
Figure 19. Principe de la synthèse chimique de 1- <i>O</i> -acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène.	87
Figure 20. Protocole d'étude de l'inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison par le glucuronide de kétoprofène <i>in vitro</i> .	90
Figure 21. Purification d'UGT adduites sur colonne échangeuse d'ions.	92
Figure 22. Structure des agents de modification chimique des acides aminés.	97
Figure 23. Comparaison des profils chromatographiques des milieux réactionnels de la synthèse enzymatique et de la synthèse chimique de glucuronide de kétoprofène.	102
Figure 24. Comparaison des spectres ^1H -RMN de glucuronide de kétoprofène synthétisé par voies enzymatique et chimique.	103
Figure 25. Stratégie de synthèse chimique de 1- <i>O</i> -acyl- β -D-glucuronide à partir d'acide carboxylique.	106

Figure 26. Inhibition par le glucuronide de kétoprofène et le kétoprofényl CoA de la glucuronoconjugaison du 1-naphtol catalysée par l'UGT1A6.	111
Figure 27. Cinétiques des inhibitions par le glucuronide de kétoprofène et le kétoprofényl CoA de la glucuronoconjugaison du 1-naphtol catalysée par l'UGT1A6.	112
Figure 28. Effet du glucuronide d'acide lithocholique sur le marquage de photo-affinité des microsomes hépatiques humains et de l'UGT2B7 avec la sonde photo-activable [β - 32 P]5N ₃ UDPGA.	115
Figure 29. Inhibition par les glucuronides de kétoprofène et d'acide lithocholique de la glucuronoconjugaison de l'androstérone catalysée par l'UGT2B7.	115
Tableau 8. Effet inhibiteur du CoA, des acides gras et de leurs acyl CoA correspondants, sur la glucuronoconjugaison du 1-naphtol, du 2-naphtol et du kétoprofène, catalysée par des microsomes hépatiques humains et par l'UGT2B1 et l'UGT1A6.	119
Figure 30. Effet du palmitoyl CoA sur la glucuronoconjugaison catalysée par les microsomes hépatiques humains.	121
Tableau 9. Inhibition de la glucuronoconjugaison par le palmitoyl CoA. Détermination des CI ₅₀ .	122
Figure 31. Inhibition par le palmitoyl CoA de la glucuronoconjugaison du 1-naphtol catalysée par l'UGT1A6. Détermination du mode d'inhibition.	123
Figure 32. Recherche d'auto-anticorps dirigés contre les UGT.	125
Figure 33. Structure chimique du kétoprofène, de l'acide lithocholique et de l'acide rétinoïque tout- <i>trans</i> .	133
Figure 34. Glucuronoconjugaison de l'androstérone et de la 4MO par l'UGT2B7.	140
Tableau 10. Spécificité de substrat de l'UGT2B7 exprimée de manière stable dans les cellules V79.	141
Figure 35. Comparaison de la spécificité de substrats des isoformes UGT2B1 (rat) et UGT2B7 (homme).	143

LISTE DES ABREVIATIONS

ACBP	<i>acyl coenzyme A binding protein</i>
AINS	anti-inflammatoire non stéroïdien
AZT	3'- azido -3'-déoxythymidine
CCM	chromatographie sur couche mince
CHAPS	3-[(3- chloro amidopropyl)diméthylammonio]-1- propane sulfonate
CI ₅₀	concentration inhibitrice de 50% de l'activité résiduelle
CLHP	chromatographie liquide haute performance
CoA	coenzyme A
COX	cyclo- oxygénase
CRABP	<i>cellular retinoic acid binding protein</i>
DCCI	<i>N, N'</i> - dicyclohexylcarbodiimide
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
EDC	<i>N</i> -éthyl- <i>N'</i> -(3- diméthylaminopropyl)carbodiimide
FABP	<i>fatty acid binding protein</i>
Hepes	acide 4-(2- hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfonique
LKM	<i>liver kidney microsome</i>
4MO	4-méthylombelliférone
<i>o</i> -UDPGA	acide uridine 5'-diphosphoglucuronique dialdéhyde
[β- ³² P]5N ₃ UDPGA	acide [β- ³² P]-5-azido- uridine 5'-diphosphoglucuronique
P450	cytochrome P450
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
RAR	<i>retinoic acid receptor</i>
RE	réticulum endoplasmique
RMN	résonance magnétique nucléaire
RXR	<i>retinoic acid X receptor</i>
TEMPO	2, 2, 6, 6- tétraméthyl-1-piperidinyloxy
UDPGA	acide uridine 5'-diphosphoglucuronique
UGT	uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransférase
WK	réactif K de Woodward (2-éthyl-5-phénylisoxazolium-3'-sulfonate)

Chapitre 1. Situation du sujet

Chapitre 1. Situation du sujet



La glucuronoconjugaison constitue un processus de détoxification majeur développé par l'homme et les autres espèces animales pour neutraliser et éliminer de l'organisme les composés présents dans l'environnement. Ce système enzymatique, à l'origine impliqué dans la biotransformation de substances intracellulaires, s'est progressivement adapté à l'apparition de nouvelles molécules, en particulier celles synthétisées par l'homme. Le principe de la glucuronoconjugaison consiste à fixer un groupement polaire, l'acide glucuronique, sur une molécule généralement lipophile, afin de permettre son excrétion sous forme de glucuronide hydrosoluble dans la bile et l'urine. Les uridine-5'-diphosphoglucuronosyltransférases (UGT, EC 2.4.1.17) représentent la famille d'enzymes qui catalysent la réaction de glucuronoconjugaison.

Le rôle multiple des UGT est illustré sur la figure 1. Ces enzymes sont responsables de la détoxification des molécules exogènes et endogènes, mais elles sont également impliquées dans des phénomènes d'activation métabolique. Par ailleurs, les UGT interviennent dans la biosynthèse de molécules glucidiques complexes.

La glucuronoconjugaison, qui permet l'élimination de xénobiotiques tels que les additifs alimentaires, les pesticides ou les polluants, a en premier lieu un rôle cytoprotecteur et génoprotecteur de l'organisme (Dutton, 1980). Cependant, des molécules telles que la 2-naphtylamine sont métabolisées chez l'homme sous forme de *N*-hydroxy-*N*-glucuronides éliminés dans l'urine. Ces métabolites, instables à pH acide, sont hydrolysés dans l'urine en hydroxylamines carcinogènes, à l'origine de l'initiation de cancers de la vessie (Young & Kadlubar, 1982).

Les UGT, qui conjuguent les substances telles que le menthol ou l'eugénol au niveau de l'épithélium olfactif, participent à la perception des odeurs.

Généralement, la glucuronoconjugaison neutralise l'effet pharmacologique des médicaments, toutes classes thérapeutiques confondues, et constitue leur principale voie d'élimination de l'organisme. Ce métabolisme varie d'un médicament à l'autre et influence leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. L'antirétroviral 3'-azido-3'-déoxythymidine (AZT, ou Zidovudine®), dirigé contre le virus d'immunodéficience humaine, est par exemple fortement glucuronoconjugué chez l'homme en métabolite inactif. Des doses élevées et répétées d'AZT doivent être administrées pour maintenir l'efficacité thérapeutique du médicament (Haumont *et al.*, 1990). Au contraire, certains glucuronides peuvent avoir une activité pharmacologique, parfois supérieure à celle du médicament de départ. Deux exemples de glucuronides actifs seront présentés ultérieurement pour illustrer ce propos : le glucuronide d'acide rétinolique tout-*trans* et le 6-*O*-glucuronide de morphine (Mehta *et al.*, 1991 ; Frances *et al.*, 1990). La glucuronoconjugaison peut également conduire à la formation de glucuronides réactifs. Les acylglucuronides, formés à partir de médicaments à structure carboxylique, sont des métabolites

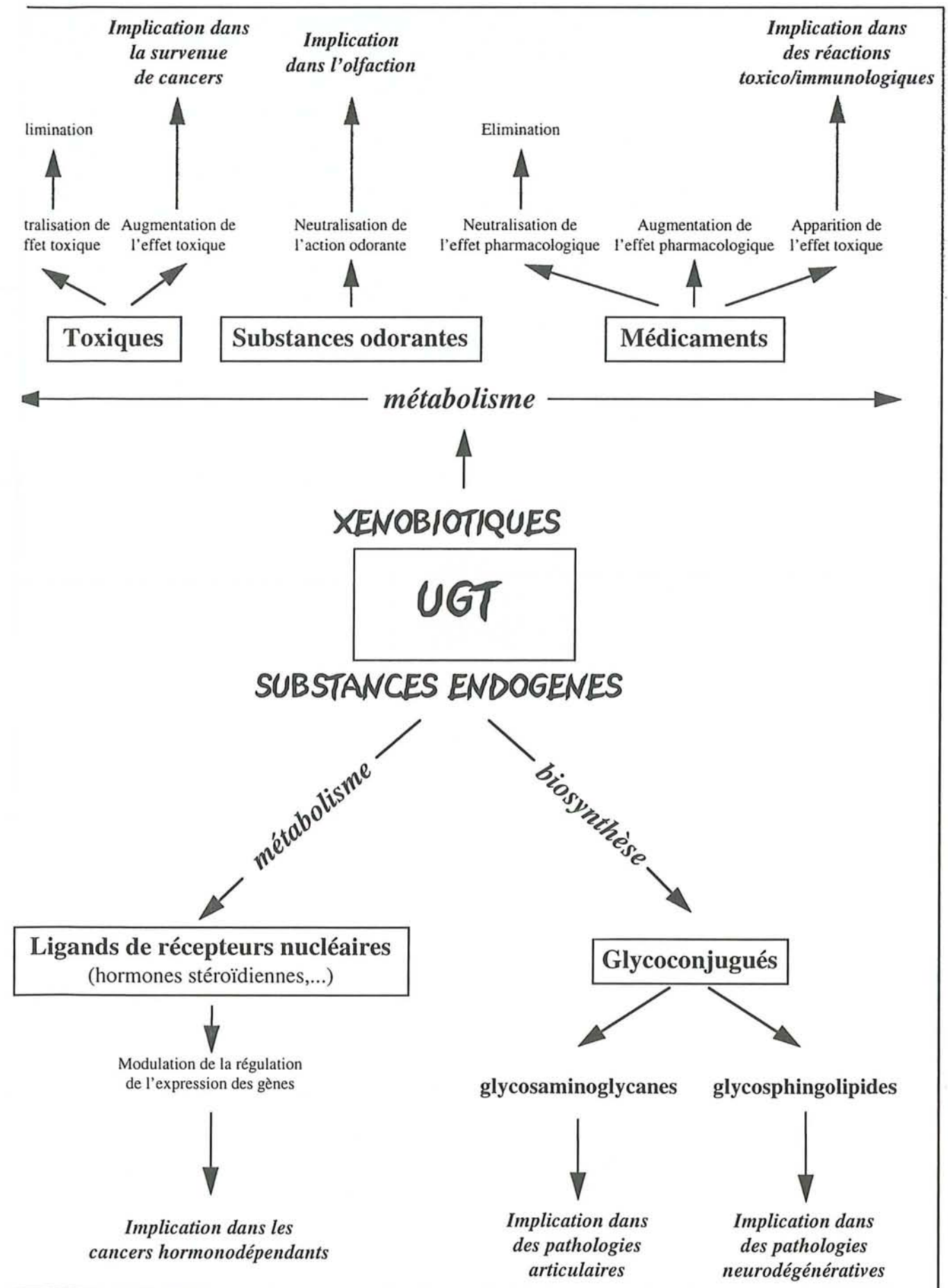


Figure 1. Implications pharmacologiques et toxicologiques et fonctions physiologiques des UGT.

électrophiles capables de se fixer de manière covalente sur les protéines plasmatiques et tissulaires pour former des adduits. Ces adduits seraient impliqués dans la survenue d'effets toxiques et/ou immuno-allergiques observés après administration de ces médicaments (Spahn-Langguth & Benet, 1992). La réactivité des acylglucuronides sera largement étudiée au cours de ce travail.

La glucuronoconjugaison est responsable de la biotransformation de substances endogènes, et par ce biais, est impliquée dans la régulation de l'activité biologique de ces molécules (Nebert, 1991). La bilirubine, issue du catabolisme de l'hémoglobine et des hémoprotéines, est un composé très toxique dont la seule voie d'élimination est la glucuronoconjugaison. Des déficiences génétiques en l'isoforme d'UGT responsable du métabolisme de la bilirubine sont à l'origine de maladies génétiques graves (maladie de Crigler-Najjar). Les UGT modulent la concentration de ligands de récepteurs cytosoliques et nucléaires comme les hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes. Ainsi, une diminution de la glucuronoconjugaison des hormones stéroïdiennes (5α -dihydrotestostérone, estradiol) conduit à leur accumulation au niveau des organes périphériques cibles (prostate, sein) et représente un facteur de prédisposition aux cancers hormonodépendants (Bélanger *et al.*, 1998). De même, la glucuronoconjugaison de l'acide rétinoïque tout-*trans* permet de moduler la concentration intracellulaire de ce ligand et sa fixation à ses récepteurs cytosoliques ou nucléaires, et influence ainsi son action dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaires (Sani *et al.*, 1992).

La glucuronoconjugaison ne se limite pas au métabolisme des xénobiotiques et des substances endogènes. La conjugaison à l'acide glucuronique participe également à la synthèse de molécules polysaccharidiques. L'organisation des protéoglycanes au sein des matrices extracellulaires et leurs interactions avec des molécules telles que les facteurs de croissance conditionnent des activités cellulaires diverses (prolifération, différenciation, adhérence, migration). Certaines formes d'UGT, localisées dans l'appareil de Golgi, sont impliquées dans la synthèse des glycosaminoglycanes, constituants majeurs des protéoglycanes (Lind *et al.*, 1993). Ainsi, les UGT, pourraient intervenir indirectement dans l'apparition de pathologies liées à des modifications qualitatives et quantitatives du métabolisme des protéoglycanes (atteintes articulaires, progression tumorale, athérosclérose, fibrose). Les UGT participent également à la synthèse des glycosphingolipides du système nerveux central et périphérique (glycoprotéines de la myéline des axones), qui sont la cible d'auto-anticorps développés lors de neuropathies dégénératives (Das *et al.*, 1991).

En conclusion, la glucuronoconjugaison ne se limite pas au métabolisme des médicaments mais s'étend au contrôle de l'activité biologique de nombreuses substances endogènes. La compréhension au niveau mécanistique de cette réaction nécessite la caractérisation moléculaire des enzymes impliquées, ainsi que la détermination des facteurs qui régulent l'activité de ces protéines.

1. La glucuronoconjugaison et les UGT

La glucuronoconjugaison est une réaction dite de phase II du métabolisme des médicaments, qui consiste en la conjugaison à l'acide glucuronique de molécules, soit directement, soit après fonctionnalisation (oxydation, réduction, hydrolyse) par les enzymes de phase I (cytochromes P450 (P450), monooxygénases, estérases, hydrolases...).

1.1. Mécanisme réactionnel de la glucuronoconjugaison

La réaction de glucuronoconjugaison fait intervenir deux substrats : un aglycone, qui possède un groupement fonctionnel nucléophile (XH), et un substrat donneur (cofacteur de la réaction), l'acide α -D-uridine-5'-diphosphoglucuronique (UDPGA) (Dutton, 1966).

L'aglycone possède un caractère lipophile qui lui permet de traverser les membranes biologiques et d'atteindre le site de la glucuronoconjugaison. Ce sont des molécules structuralement non apparentées qui portent un ou plusieurs groupement(s) fonctionnel(s) nucléophile(s) de type hydroxyle (alcool ou phénol), carboxyle, amine (primaire, secondaire ou tertiaire) ou encore thiol. Les produits de la glucuronoconjugaison sont alors respectivement des étherglucuronides, des acyl(ester)glucuronides (*O*-glucuronides), des *N*-glucuronides ou encore des *S*-glucuronides. A titre d'exemples, le diflunisal (Loewen *et al.*, 1988) et l'acide lithocholique (Radominska-Pyrek *et al.*, 1986) possèdent à la fois une fonction hydroxyle et une fonction carboxyle. Ces composés sont glucuronoconjugués sur chacun des deux groupements fonctionnels et sont ainsi à l'origine de la formation d'un éther et d'un acylglucuronide.

L'UDPGA, qui représente la forme activée de l'acide α -D-glucuronique, est synthétisé en deux étapes dans le cytoplasme (figure 2). La première étape, catalysée par une pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9), correspond à la formation de l'UDP-glucose à partir des précurseurs glucose-1-phosphate et UTP. L'UDP-glucose est, lors de la deuxième étape, oxydé en UDPGA par une déshydrogénase (EC 1.1.1.22) en présence de NAD⁺ (Dutton, 1966).

Le mécanisme réactionnel de la glucuronoconjugaison catalysée par les UGT (figure 3), consiste en une attaque nucléophile de l'aglycone sur le carbone C₁ de l'UDPGA, selon un mécanisme de substitution nucléophile d'ordre 2 avec inversion de configuration (inversion de Walden). Elle conduit à la formation de 1- β -D-glucuronide (Dutton, 1980).

1.2. Les UGT

1.2.1. Nomenclature et classification des UGT

Les techniques de purification protéique (Irshaid & Tephly, 1987), puis l'isolement et le séquençage des ADNc ont permis de démontrer sans ambiguïté l'existence de multiples isoformes d'UGT.

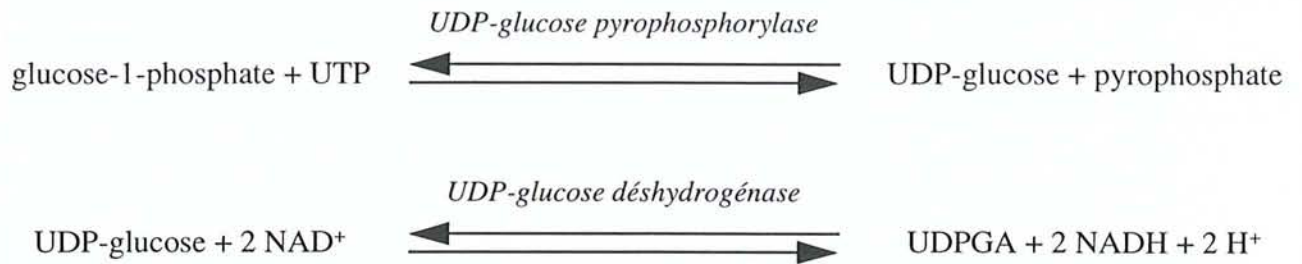


Figure 2. Synthèse de l'UDPGA (d'après Dutton, 1966).

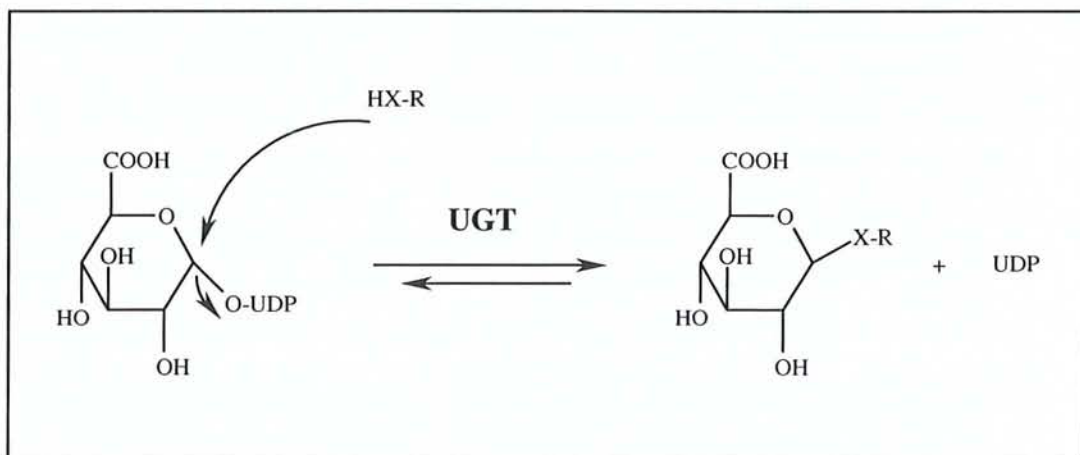


Figure 3. Principe de la réaction de glucuronoconjugaison.
(HX-R = aglycone)

La nomenclature des UGT, appelées autrefois UDPGT, a évolué suite à la découverte de plusieurs dizaines d'isoformes et de l'organisation complexe des gènes qui codent pour ces protéines.

En 1991, une nomenclature officielle basée sur l'homologie de séquence primaire déduite des ADNc a été définie (Burchell *et al.*, 1991). Cette nomenclature a répertorié environ trente isoformes en deux familles d'UGT (UGT1 et UGT2), dont les gènes ont évolué à partir d'un gène ancestral unique. Depuis 1991, de nombreuses isoformes ont été clonées chez les mammifères et dans d'autres espèces eucaryotes et procaryotes, conduisant à la réactualisation de cette nomenclature.

Ainsi, en 1997, une nouvelle nomenclature, également basée sur l'homologie de séquence primaire et analogue à la nomenclature des P450, a été mise en place par un comité d'experts internationaux (Mackenzie *et al.*, 1997). La super-famille des UGT s'est alors élargie à une super-famille d'UDP-**glycosyl**transférases, qui catalysent la fixation d'un glucide sous forme activée d'UDP (UDPGA, UDP-galactose, UDP-glucose ou UDP-xylose) sur un aglycone possédant un groupement fonctionnel nucléophile. Désormais, chaque enzyme de cette super-famille est désignée par le nom du gène dont elle est issue (*UGT* ou *ugt* chez la souris et la drosophile), suivi d'un chiffre arabe qui désigne la famille, d'une lettre majuscule qui correspond à la sous-famille, et enfin d'un second chiffre arabe propre au gène. Les numéros des familles 1 à 50 sont attribués aux animaux, 51 à 70 aux levures, 71 à 100 aux plantes, 101 à 200 aux bactéries. Dans le cas de la famille 1, le second chiffre arabe n'identifie pas le gène propre mais le numéro de l'exon codant pour la partie *N*-terminale de l'enzyme.

A titre d'exemple, l'*UGT2B1* est le gène numéro 1 de la sous-famille B et de la famille 2, appartenant à la super-famille des UDP-glycosyltransférases.

Plus de 100 ADNc codant pour des gènes d'animaux, de levures, de plantes et de bactéries ont été clonés à ce jour. Trente-trois familles dérivées d'un gène ancestral unique ont ainsi été identifiées (Mackenzie *et al.*, 1997).

Les UGT de mammifères qui présentent plus de 50% d'homologie de séquence primaire sont considérées comme appartenant à la même famille et celles qui présentent plus de 60% d'homologie appartiennent à la même sous-famille. Environ cinquante gènes *UGT*, répertoriés en trois familles (1, 2 et 8), ont été séquencés chez les mammifères (tableau 1).

La famille 1 comporte un groupe de protéines codées par le gène complexe *UGT1*, situé sur la région q37 du chromosome 2 humain (Mackenzie *et al.*, 1997). L'organisation du gène *UGT1* est représenté sur la figure 4. Seize exons ont été actuellement identifiés sur le gène. Le transcrit primaire, par épissage alternatif, produit un ARNm comportant un des douze exons 1 et les exons 2 à 5. Chacun des douze exons 1, associé aux quatre derniers exons (2 à 5), est alors considéré comme un gène distinct. Les exons 2 à 5 codent pour la partie *C*-terminale de la protéine alors que les exons 1 pour la partie *N*-terminale. Ainsi, les UGT de la famille 1 possèdent des domaines *N*-terminaux qui ont entre 37 et 90% d'homologie et des domaines *C*-terminaux identiques (Ritter *et al.*, 1992). Les exons 1A2, 1A11 et 1A12 sont des pseudogènes qui contiennent des mutations

Tableau 1. Les 47 gènes UGT de mammifères actuellement clonés (d'après Mackenzie et al., 1997).

NOM DU GENE	NOM COMMUN	ESPECE
<i>UGT1A1</i>	B1	Rat
<i>UGT1A1</i>	HUG-Br1	Homme
<i>Ugt1a1</i>	UgtBr1	Souris
<i>UGT1A2</i>	Bilirubin, B2	Rat
<i>UGT1A2P</i>	1bp	Homme
<i>UGT1A3</i>	B3	Rat
<i>UGT1A3</i>	1c	Homme
<i>UGT1A4P</i>	B4	Rat
<i>UGT1A04</i>	Ugt1-4c	Lapin
<i>UGT1A4</i>	HUG-Br2	Homme
<i>UGT1A5</i>	B5	Rat
<i>UGT1A5</i>	1e	Homme
<i>UGT1A6</i>	4NP	Rat
<i>UGT1A6</i>	HlugP1	Homme
<i>UGT1A6</i>	Ugt1-6	Lapin
<i>Ugt1a6</i>		Souris
<i>UGT1A7</i>	A2	Rat
<i>UGT1A7</i>	1g	Homme
<i>UGT1A8</i>	A3	Rat
<i>UGT1A8</i>	1h	Homme
<i>UGT1A9P</i>	A4	Rat
<i>UGT1A9</i>	HlugP4	Homme
<i>Ugt1a9</i>	mUGTBr/P	Souris
<i>UGT1A10</i>	1j	Homme
<i>UGT1A11P</i>	1k	Homme
<i>UGT1A12P</i>	1l	Homme
<i>UGT1B1</i>		Poisson
<i>UGT2A1</i>	Olfrat	Rat
<i>UGT2A1</i>	Olfbov	Boeuf
<i>UGT2B1</i>	r-2	Rat
<i>UGT2B2</i>	r-4	Rat
<i>UGT2B3</i>	r-3, Rlug38	Rat
<i>UGT2B4</i>	Hlug25, h-1, h-20	Homme
<i>Ugt2b5</i>	m-1	Souris
<i>UGT2B6</i>	r-5	Rat
<i>UGT2B7</i>	h-2, Hlug6	Homme
<i>UGT2B8</i>		Rat
<i>UGT2B9</i>		Singe
<i>UGT2B10</i>	h-46	Homme
<i>UGT2B12</i>		Rat
<i>UGT2B13</i>	Egt10	Lapin
<i>UGT2B14</i>	Egt12	Lapin
<i>UGT2B15</i>	h-3, Hlug4	Homme
<i>UGT2B16</i>		Lapin
<i>UGT2B17</i>		Homme
<i>UGT2C1</i>	2C1	Lapin
<i>UGT8</i>	rCerGT	Rat
<i>UGT8</i>	hCerGT	Homme
<i>Ugt8</i>	mCerGT	Souris

En grisé, les UGT considérées dans ce travail

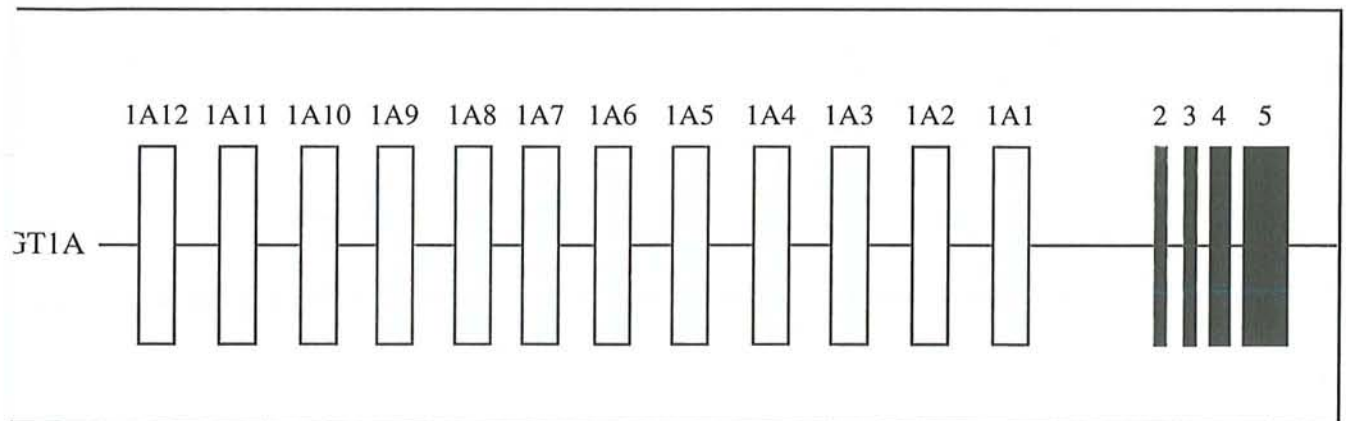


Figure 4. Organisation du gène UGT1 humain (d'après Ritter et al., 1992).

Les barres noires correspondent aux exons codant pour la région C-terminale commune à l'ensemble des isoformes de la famille 1. Les barres grises indiquent les exons codant pour la région N-terminale variable. Les barres blanches représentent des pseudogènes.

ionsens. L'organisation du gène *UGT1* est identique chez le rat avec neuf exons 1 (Emi *et al.*, 1995). Les protéines de la famille 1 conjuguent principalement la bilirubine et les composés phénoliques plans et encombrés (naphtol, paracétamol, chloramphénicol).

Les UGT de la famille 2 sont codées par des gènes différents. Ces gènes sont constitués de six exons et sont localisés sur les régions q28 et q13 du chromosome 4 humain. La famille UGT2 comprend actuellement dix-huit membres répartis en trois sous-familles A, B et C. La sous-famille 2A est représentée par des isoformes présentes dans l'épithélium olfactif et responsables de la conjugaison des substances odorantes (Lazard *et al.*, 1991). La sous-famille 2B est constituée de protéines qui conjuguent les acides carboxyliques, les alcools, les amines et les thiols. Ainsi, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) de la série des profènes, la morphine, les acides biliaires et les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes sont majoritairement pris en charge par cette sous-famille chez l'animal et chez l'homme. La sous-famille 2C possède une unique isoforme de lapin dont la séquence diverge des autres membres de la sous-famille 2B de lapin (Tukey *et al.*, 1993).

La famille des UGT8 est représentée chez le rat, l'homme et la souris par des galactosyltransférases qui conjuguent le galactose à des céramides cérébraux (Mackenzie *et al.*, 1997).

D'autres UGT ont été clonées au cours de programmes de séquençage systématique du génome d'organismes tels que *C. elegans* sous forme d'"expression sequence tags", mais ces UGT n'ont pas été formellement identifiées par expression des ADNc correspondants (Mackenzie *et al.*, 1997).

1.2.2. Propriétés générales des UGT

La spécificité de substrat des UGT est variable selon l'isoforme considérée. Elle semble plus marquée à l'égard des composés endogènes que vis-à-vis des substrats exogènes (Tephly & Burchell, 1990). Ainsi, chez le rat, les stéroïdes 17 β -hydroxylés (testostérone) sont conjugués par l'UGT2B1 alors que les 3 α -hydroxylés (androstérone) le sont par l'UGT2B2 (Mackenzie *et al.*, 1992). Mais plus généralement, une isoforme peut catalyser la conjugaison de plusieurs molécules et inversement un même aglycone peut être conjugué par différentes isoformes (Hamdoun *et al.*, 1995). Certaines isoformes ont même une spécificité de substrat très large et sont capables de métaboliser une vaste gamme de molécules, du moins *in vitro* (Burchell *et al.*, 1995).

Les UGT sont des enzymes inductibles. L'expression des isoformes d'UGT peut être régulée de manière plus ou moins sélective par différents inducteurs. L'induction résulte d'une biosynthèse *de novo* de l'enzyme. Elle met en jeu des récepteurs cytosoliques de la molécule inductrice par le biais desquels la transcription des gènes qui codent pour les UGT est activée (Clarke & Burchell, 1994).

Trois grands groupes d'inducteurs ont été répertoriés à partir des résultats obtenus lors d'études menées principalement *in vitro* chez le rat. Les inducteurs de type hydrocarbures

polycycliques aromatiques plans (3-méthylcholanthrène, dioxine) augmentent, *via* le récepteur Ah, l'expression des isoformes de la famille 1 (Mackenzie *et al.*, 1989). Les inducteurs de type phénobarbital stimulent la biosynthèse de nombreuses isoformes, en particulier celles qui conjuguent les composés phénoliques encombrés et les isoformes de la famille 2 responsables de la conjugaison des acides carboxyliques (UGT2B1) (Mackenzie *et al.*, 1989). Enfin, les inducteurs de type proliférateurs des peroxysomes (fibrates) augmentent spécifiquement l'expression de l'UGT1A1, dont le principal substrat est la bilirubine (Magdalou *et al.*, 1993).

Les effets des inducteurs peuvent s'avérer différents d'une espèce à l'autre. Ainsi, le phénobarbital n'induit pas l'UGT impliquée dans la glucuronoconjugaison de la morphine chez l'homme (UGT2B7), alors qu'il est un puissant inducteur de l'isoforme orthologue chez le rat (UGT2B1) (Burchell & Coughtrie, 1989).

L'étude de l'organisation des promoteurs impliqués dans les phénomènes de régulation génique est un domaine en pleine expansion. Bernard *et al.* (1999) ont caractérisé le gène *ugt1* chez la souris. Le promoteur de ce gène ne comporte pas de séquence TATA comme observé chez l'homme. Cependant, cette équipe a montré que la transcription du gène UGT1A1 est augmentée chez la souris comme chez l'homme par le facteur de transcription hépatique "hepatocyte nuclear factor 1". Par ailleurs, la découverte d'un autre facteur de transcription hépatique, le "CCAAT/enhancer binding protein" semble indispensable à l'activité basale du promoteur du gène *ugt1* chez la souris (Bernard *et al.*, 1999) et du gène *UGT2B1* chez le rat (Hansen *et al.*, 1998).

Les UGT sont essentiellement exprimées dans le foie, mais sont également présentes dans de nombreux autres tissus. Ces enzymes sont distribuées dans le rein (métabolisme de la morphine, Mazoit *et al.*, 1990), l'intestin (métabolisme des phénols plans et de la bilirubine, Minners & Mackenzie, 1991), le cerveau (Suleman *et al.*, 1998), la peau (Vecchini *et al.*, 1995), l'épithélium olfactif (Lazard *et al.*, 1991), le poumon (Vainio *et al.*, 1995), la rate, le thymus, le sein, ou la prostate (Bélanger *et al.*, 1995). Certaines isoformes semblent ubiquitaires (UGT1A6) alors que d'autres ont une localisation spécifique d'un tissu. L'UGT2A1 est, par exemple, spécifiquement exprimée dans l'épithélium olfactif (Lazard *et al.*, 1991). La localisation de l'UGT1A7 et de l'UGT1A10 est, quant à elle, spécifique de l'estomac et de l'épithélium de la vésicule biliaire (Strassburg *et al.*, 1997).

1.2.3. Domaines structuraux et organisation membranaire des UGT

Les UGT sont des protéines transmembranaires de 50 à 60 kDa, principalement localisées dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans la membrane périnucléaire des cellules (Mulder, 1992). Les principaux domaines structuraux et l'organisation membranaire des UGT sont représentés schématiquement sur les figures 5 et 6.

Deux principaux domaines structuraux ont été mis en évidence. L'extrémité *N*-terminale correspond au domaine variable des différentes isoformes d'UGT. Ce domaine comporte le site de fixation de l'aglycone et serait responsable de la spécificité de substrat (Mackenzie, 1990).

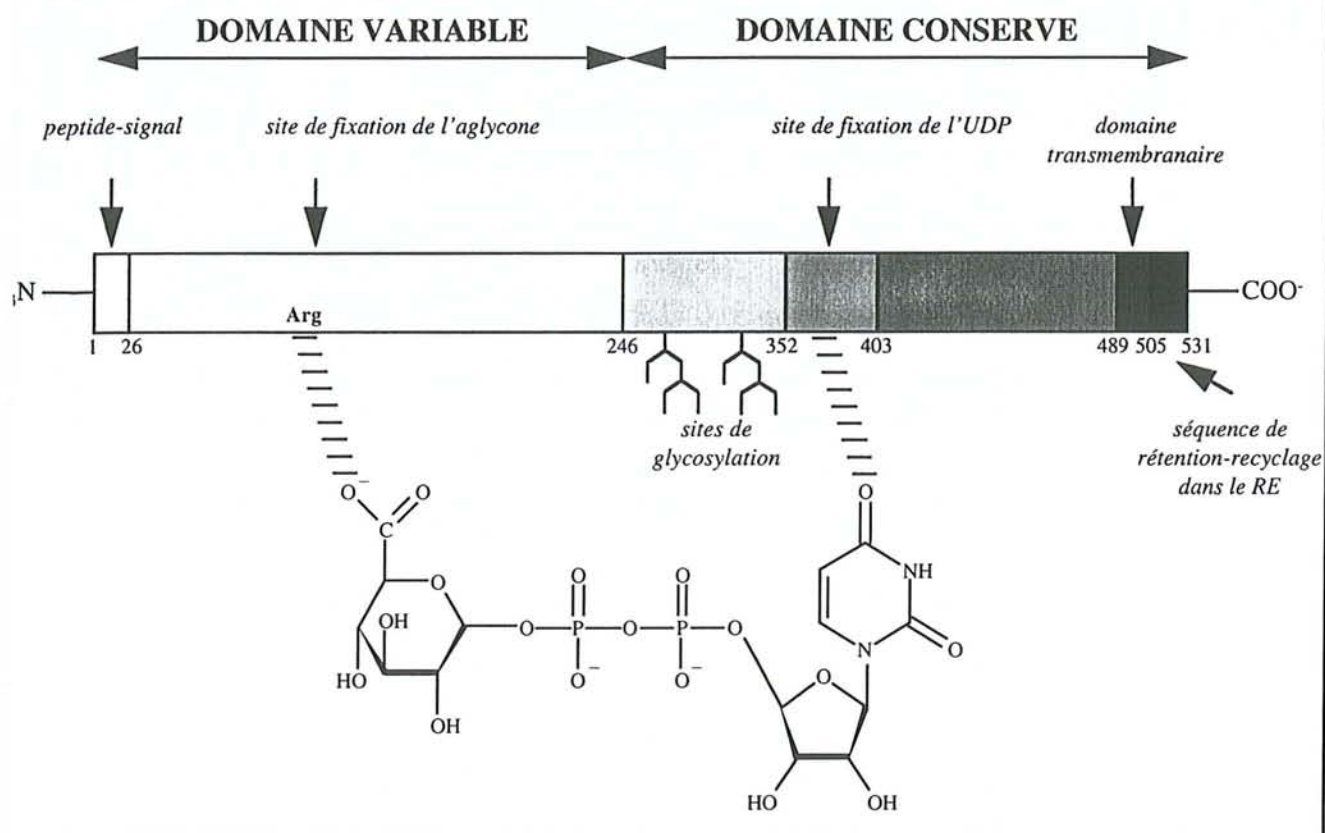


Figure 5. Représentation des principaux domaines structuraux des UGT.
(sites hypothétiques de fixation des substrats)

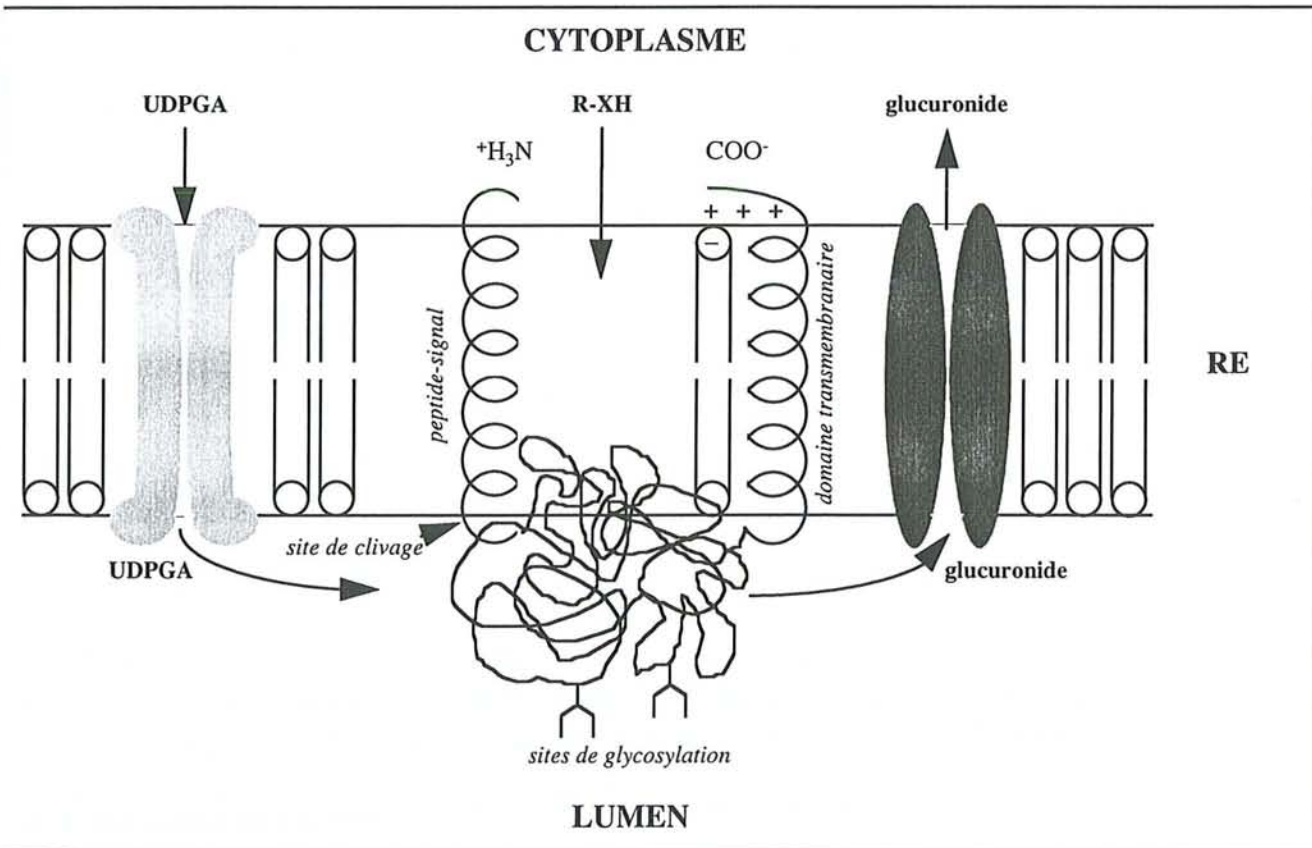


Figure 6. Représentation de l'organisation membranaire des UGT dans le RE.
(d'après Burchell & Coughtrie, 1989)

L'extrémité C-terminale représente le domaine conservé des multiples isoenzymes. La fonction carboxyle de l'UDPGA interagirait avec un acide aminé arginine localisé dans la région N-terminale. Le groupement UDP de l'UDPGA se fixerait, quant à lui, dans une région très conservée au sein des UGT, située entre l'acide aminé 299 et 446 (Pillot *et al.*, 1993).

La plupart des UGT présentent des sites de glycosylation. Ils sont responsables, d'un point de vue expérimental, d'une diminution de la mobilité des protéines dans les gels de polyacrylamide (Yokota *et al.*, 1992). Leur rôle n'est pas encore défini. Ils ne paraissent cependant pas être essentiels à l'activité catalytique ou à la spécificité de substrat des UGT. Ils ne semblent pas non plus participer à la stabilité de ces protéines (Mackenzie *et al.*, 1992).

Les UGT sont traduites sous forme de précurseurs qui présentent une séquence peptide-signal N-terminale (23 à 27 acides aminés). Ce peptide-signal, clivé par les signal-peptidases microsomales, est responsable de la translocation de la protéine à travers la membrane du RE (Mackenzie, 1990). L'extrémité N-terminale des UGT pourrait également être impliquée dans la formation de dimères catalytiquement actifs (Meech & Mackenzie, 1997). Une séquence "stop-transfert" C-terminale très hydrophobe (17 acides aminés) serait à l'origine de l'arrêt de la translocation de la protéine à travers la membrane et constitue l'unique segment transmembranaire de la protéine dans le RE. La présence d'acides aminés lysines à l'extrémité C-terminale localisée du côté cytosolique du RE, constitue un signal de rétention de la protéine dans ce compartiment (Mackenzie *et al.*, 1992). Par ailleurs, des travaux récents, réalisés sur l'UGT2B1 (Meech & Mackenzie, 1998) et sur l'UGT1A6 (Ouzzine *et al.*, 1999a et b), suggèrent l'existence d'autres éléments d'insertion membranaire N-terminaux, impliqués dans l'adressage et la rétention de la protéine dans le RE.

Ces mécanismes d'adressage impliquent que la protéine est localisée essentiellement du côté luminal du RE (Burchell & Coughtrie, 1989). Cette orientation intraluminaire du site actif de l'enzyme nécessite l'existence de transporteurs transmembranaires. En effet, le caractère hydrophile de l'UDPGA et des glucuronides ne leur permet pas de traverser les membranes lipidiques. L'identification de ces systèmes de transport a fait l'objet de nombreuses études dont les résultats sont controversés.

Ainsi, un transporteur serait responsable de l'acheminement de l'UDPGA, depuis le cytoplasme où il est synthétisé vers la lumière du RE, tandis que d'autres systèmes de transport permettraient l'excrétion du glucuronide depuis la lumière du RE où il est formé vers le cytoplasme. Berg *et al.* (1995) ont suggéré que le transporteur impliqué dans l'acheminement de l'UDPGA à travers la membrane du RE est indépendant des UGT. Un système d'antiport, qui exporterait les glucuronides hydrosolubles de manière concomitante à l'importation de l'UDPGA, a également été décrit (Banhegyi *et al.*, 1996). Battaglia *et al.* (1996) ont suggéré l'existence de deux systèmes de transport avec des affinités différentes pour l'UDPGA. Cette équipe a également montré l'implication directe d'acides aminés histidine dans les systèmes de transport de l'UDPGA dans des microsomes de rat intacts (Battaglia & Radominska-Pandya, 1998).

Une autre hypothèse propose l'existence d'homo ou d'hétérodimères d'UGT fonctionnels. Ikushiro *et al.* (1997) ont ainsi montré l'interaction entre des monomères d'UGT de la famille 1 et l'UGT2B1 dans des microsomes hépatiques de rat. Ces auteurs suggèrent que ces hétérodimères pourraient jouer le rôle de canaux permettant le transport de l'UDPGA à travers la membrane du RE.

Par ailleurs, les "canalicular multispecific organic anion transporters", situés dans la membrane plasmique des hépatocytes, seraient impliqués dans l'excrétion des glucuronides à l'extérieur de la cellule. Ces transporteurs présentent une large spécificité et agissent comme des pompes à exporter les glucuronides (Buchler *et al.*, 1996).

L'activité enzymatique des UGT est sous dépendance stricte des lipides membranaires (Zakim *et al.*, 1988). La lipidodépendance de ces enzymes rendent leur purification sous forme active très difficile (Burchell *et al.*, 1995). L'état natif des UGT au niveau de la membrane du RE est dit "latent" (Dutton, 1966). Cet état contraint peut être cependant activé en un état non contraint par des agents physiques (sonication) ou chimiques (détergents). Ces agents, en désorganisant la structure de la membrane lipidique, augmentent jusqu'à 20 fois l'activité catalytique basale des UGT. Cette activation résulterait soit d'un changement conformationnel de l'enzyme (hypothèse conformationnelle, Zakim & Dannenberg, 1992), soit d'une augmentation de l'accessibilité de l'UDPGA au site actif (hypothèse compartimentale, Tephly & Burchell, 1990).

1.2.4. Etudes mécanistiques et structurales des UGT

Comme nous l'avons souligné, la lipidodépendance des UGT et l'existence de multiples isoformes présentant des caractéristiques physicochimiques très proches et des spécificités de substrat chevauchantes, sont des facteurs qui limitent leur purification. Ces difficultés de purification ainsi que la taille des UGT (50 à 60 kDa) rendent peu propices leur analyse structurale directe par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou par rayons X. Les stratégies d'études moléculaires des UGT consistent donc à mettre en œuvre des approches alternatives, dont quelques unes ont été introduites et développées dans notre laboratoire et au cours de ce travail.

1) Le clonage et l'expression stable et fonctionnelle des isoformes, notamment les UGT1A6 (homme), 2B7 (homme) et 2B1 (rat), dans des systèmes cellulaires hétérologues, permettent l'analyse individuelle de la spécificité de substrat de ces isoformes.

2) Le développement et l'utilisation d'inhibiteurs (inhibiteurs compétitifs, analogues de l'état de transition, sondes de photo-affinité, agents de modification chimique) permettent de déterminer les domaines peptidiques et les classes d'acides aminés potentiellement impliqués dans la catalyse et/ou la fixation des substrats.

3) La modélisation moléculaire, la comparaison de séquence primaire des isoformes, fournissent également des informations sur la structure du site actif des UGT ainsi que sur la découverte de nouveaux éléments topogéniques responsables de l'adressage et de l'organisation membranaire de ces protéines.

4) Ces approches, couplées à la mutagenèse dirigée, permettent d'identifier définitivement les acides aminés impliqués dans la structure ou l'activité catalytique des UGT et dans la spécificité de substrat des différentes isoenzymes.

Dans le cadre de notre travail, l'utilisation d'agents de modification chimique et de marqueurs d'affinité a été mise en œuvre pour l'exploration des sites actifs des UGT1A6 et UGT2B7 humaines. La description du principe de ces deux techniques d'investigation ainsi que leurs diverses applications sont ici rapportées.

1.2.4.1. Modification chimique des protéines

La modification chimique des protéines consiste en une réaction irréversible et raisonnablement spécifique entre un agent chimique et des acides aminés des protéines.

Les groupements chimiques les plus réactifs au sein des protéines sont généralement nucléophiles et correspondent à ceux impliqués dans la catalyse des réactions enzymatiques. Ce sont plus précisément les fonctions OH des sérines, thréonines et tyrosines, les fonctions NH_2 des lysines et arginines ainsi que le groupement NH_2 terminal des protéines, le cycle imidazole de l'histidine, la fonction SH des cystéines, la fonction COOH des acides aspartique et glutamique ainsi que le groupement COOH terminal des protéines. De plus, l'atome de soufre de la méthionine et le cycle aromatique de la tyrosine sont nucléophiles envers les centres faiblement électrophiles. En conséquence, la majorité des agents de modification chimique utilisés ont un caractère électrophile. Pour exemples, le chlorure de dansyl et la 2,3-butanedione sont respectivement des agents de modification des lysines et des arginines, le diéthylpyrocarbonate réagit avec les histidines, les maléimides (*N*-éthylmaléimide) modifient les cystéines, et les carbodiimides et le 2-éthyl-5-phénylisoxazolium-3'-sulfonate ou réactif K de Woodward (WK) ont une réactivité dirigée vers les acides carboxyliques.

La modification chimique des enzymes par liaison covalente se traduit par une perte irréversible de l'activité si : (1) un acide aminé essentiel à la catalyse de la réaction est bloqué, (2) le site de fixation du substrat est stériquement encombré, (3) la conformation de la protéine est modifiée. Au contraire, si la modification chimique n'affecte pas l'activité, c'est que l'acide aminé modifié n'a pas un rôle important.

L'utilisation de la modification chimique des protéines permet de déterminer le rôle éventuel des acides aminés modifiés dans la réaction enzymatique. Plus précisément, l'analyse des paramètres cinétiques de l'inactivation par les agents chimiques donne des indications sur la fonction structurale ou catalytique de l'acide aminé modifié. L'augmentation du K_m renseigne sur le rôle de l'acide aminé modifié dans l'organisation structurale du site actif de la protéine alors qu'une diminution de la $V_{\max}$ implique plutôt un rôle de l'acide aminé modifié dans le mécanisme catalytique de l'enzyme. D'autre part, la structure du réactif donne des indications sur le degré d'accessibilité de l'acide aminé modifié et sur le caractère hydrophile ou hydrophobe de son environnement. Cependant, l'inconvénient majeur de l'utilisation des agents de modification

chimique reste le manque de spécificité de certains d'entre eux pour un type d'acide aminé ou pour un acide aminé donné localisé dans la protéine. Ces problèmes peuvent toutefois être résolus par des expériences de protection au moyen de ligands connus du site de fixation dans lequel l'identification des acides aminés est recherchée ou par des conditions expérimentales faisant varier le pH (titrage de l'acide aminé en question).

L'utilisation des agents de modification chimique a fourni des informations utiles quant au mécanisme de la glucuronoconjugaison. Battaglia *et al.* (1994a) ont montré, grâce à la modification chimique de l'UGT1A6 recombinante par le diéthylpyrocarbonate, l'implication d'un acide aminé histidine dans le processus catalytique de l'enzyme. L'étude de l'effet du pH sur l'activité de l'UGT1A6 a révélé l'implication de deux acides aminés déprotonés au pH optimum de la réaction enzymatique (pH 7,4). L'un d'eux a été identifié comme une histidine. Après titration des acides aminés modifiés, la détermination de l'ordre de grandeur du pKa (compris entre 5 et 6) a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle le second acide aminé impliqué serait un acide aspartique ou glutamique. Notre équipe, en utilisant les carbodiimides comme agents de modification chimique, a confirmé l'implication d'acides aminés carboxyliques dans l'activité catalytique de l'UGT1A6 (Battaglia *et al.*, 1994b). D'autre part, Zakim *et al.* (1983) ont suggéré, par modification chimique au moyen de la 2,3-butanedione, l'interaction du groupement COOH de l'UDPGA avec une arginine. L'utilisation d'agents de modification chimique, combinée à la mutagenèse dirigée, a permis de montrer que l'arginine 52 et l'histidine 54, acides aminés très conservés au sein du domaine N-terminal des UGT, sont indispensables à l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'UGT1A6, mais ne sont pas directement impliqués dans l'activité catalytique de l'enzyme (Senay *et al.*, 1997).

L'ensemble de ces résultats a permis d'émettre un mécanisme hypothétique de la réaction de glucuronoconjugaison catalysée par l'UGT1A6 humaine (figure 7). Trois acides aminés sont mis en jeu : une histidine, un acide aspartique ou glutamique catalytique et une arginine qui stabiliserait le cosubstrat de la réaction. L'aspartate ou le glutamate délocaliserait le proton du groupement imidazole de l'histidine, augmentant ainsi le caractère basique de cet acide aminé. L'azote rendu ainsi plus réactif par ce relais de charge est alors capable d'arracher le proton du groupement hydroxyle de l'aglycone, ce qui permet l'attaque par substitution nucléophile d'ordre 2 de l'oxygène sur le C₁ de l'UDPGA avec libération de l'UDP. Ce schéma réactionnel n'exclut pas l'implication d'autres acides aminés (Senay *et al.*, 1997).

Dans le cadre de nos travaux, l'utilisation des agents de modification chimique, couplée à la mutagenèse dirigée et à l'alignement de séquences protéiques, a permis d'analyser le rôle éventuel d'acides aminés cystéines dans l'activité de l'UGT1A6 recombinante humaine. Nous avons d'autre part employé ces mêmes stratégies d'étude pour l'investigation du site de fixation de l'acide rétinoïque tout-*trans* sur l'UGT2B7 recombinante humaine.

1.2.4.2. Marqueurs d'affinité

Les marqueurs d'affinité sont caractérisés par deux propriétés fondamentales. D'une part, ces composés, dont la structure chimique est apparentée à celle du(des) substrat(s) de la protéine,

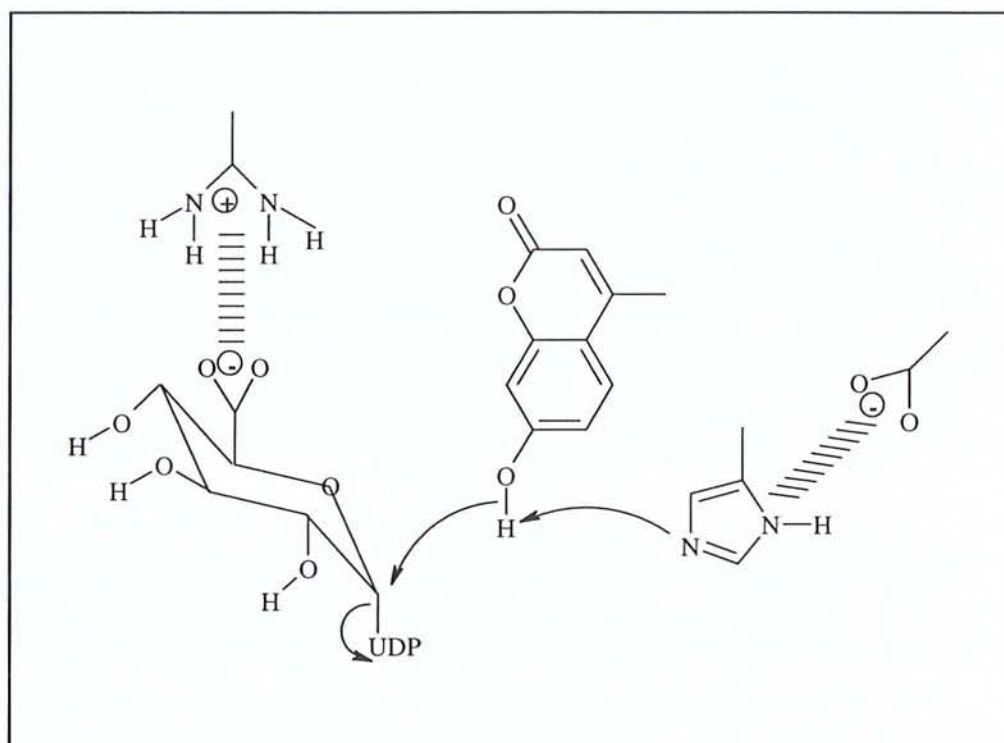


Figure 7. Mécanisme réactionnel hypothétique de la glucuronoconjugaison de la 4MO par l'UGT1A6.

interagissent spécifiquement avec les sites de fixation de ces substrats. D'autre part, ces composés possèdent des groupements réactifs qui forment des liaisons covalentes avec les acides aminés des protéines. Cette réactivité leur confère un caractère d'inhibiteurs irréversibles des enzymes. La réaction d'un marqueur d'affinité avec une enzyme fait intervenir la formation d'un complexe réversible enzyme-marqueur d'affinité préalable à la fixation irréversible du marqueur d'affinité sur la protéine. Ce mécanisme est analogue à celui de Michaelis-Menten et la réaction doit montrer une cinétique de saturation en fonction de l'augmentation de la concentration en marqueur d'affinité. Les marqueurs d'affinité possèdent en outre un groupement radioactif ou fluorescent qui permet de visualiser les protéines marquées.

Une partie de notre travail a consisté à synthétiser un marqueur d'affinité analogue du site de fixation de l'UDPGA, l'acide uridine 5'-diphosphoglucuronique dialdéhyde (*o*-UDPGA, figure 8A). Nous montrerons que ce marqueur d'affinité, qui réagit plus spécifiquement avec des acides aminés lysine, constitue un outil complémentaire pour identifier les acides aminés impliqués dans le site de fixation du cofacteur de la réaction de glucuronoconjugaison (Battaglia *et al.*, 1998).

Les sondes photo-activables sont des marqueurs d'affinité particuliers dont le groupement réactif est photo-activable, généralement une fonction diazo ou azido qui engendre un intermédiaire très réactif après photolyse. L'irradiation par les rayons ultra-violet (UV) du complexe dissociable protéine-sonde produit un intermédiaire réactif de courte durée de vie qui conduit à la formation d'un complexe covalent.

Les marqueurs d'affinité présentent l'avantage d'être dirigés spécifiquement vers le site actif des enzymes. Ils permettent ainsi, après hydrolyse de la protéine et séquençage des peptides marqués, d'identifier les acides aminés réellement présents dans le site actif de la protéine étudiée.

L'équipe de Drake *et al.* (1991) a synthétisé une sonde photo-activable analogue de l'UDPGA, l'acide [β - 32 P]-5-azido-uridine-5'-diphosphoglucuronique ([β - 32 P]5N₃UDPGA, figure 8B). L'utilisation de cette sonde a permis de confirmer, entre autre, que le site actif des UGT (Drake *et al.*, 1992) et d'autres UDP-glycosyltransférases (Little *et al.*, 1995) est orienté du côté luminal du RE. Elle a également été utilisée pour l'investigation des acides aminés présents dans le site de fixation de l'UDPGA sur l'UGT1A6 recombinante humaine (Battaglia *et al.*, 1996) ainsi que pour l'étude du transporteur de l'UDPGA (Battaglia & Radomska-Pandya, 1998). Dans le cadre de notre étude sur la réactivité des acylglucuronides sur les UGT, l'utilisation de [β - 32 P]5N₃UDPGA comme compétiteur de ces métabolites, sera employée pour déterminer le site de fixation des acylglucuronides sur les UGT. Nous testerons également l'acide rétinoïque tout-*trans* marqué au tritium sur les carbones 11 et 12 ([3 H]acide rétinoïque, figure 8C) comme sonde photo-activable du site de fixation de l'acide rétinoïque tout-*trans* sur les protéines (UGT et CRABP). Enfin, Senay *et al.* (1999) ont développé une sonde de photo-affinité fluorescente, la 7-azido-4-méthylcoumarine. Cette sonde, qui présente des analogies structurales avec des composés phénoliques substrats de l'UGT1A6 (7-amino-méthylcoumarine, coumarine), interagit spécifiquement avec le site de fixation de ces substrats. L'utilisation de cette sonde a pour but d'identifier les peptides impliqués dans la fixation de ces aglycones au niveau du site actif de l'UGT1A6. Elle peut également être appliquée à la caractérisation du site de fixation de ces

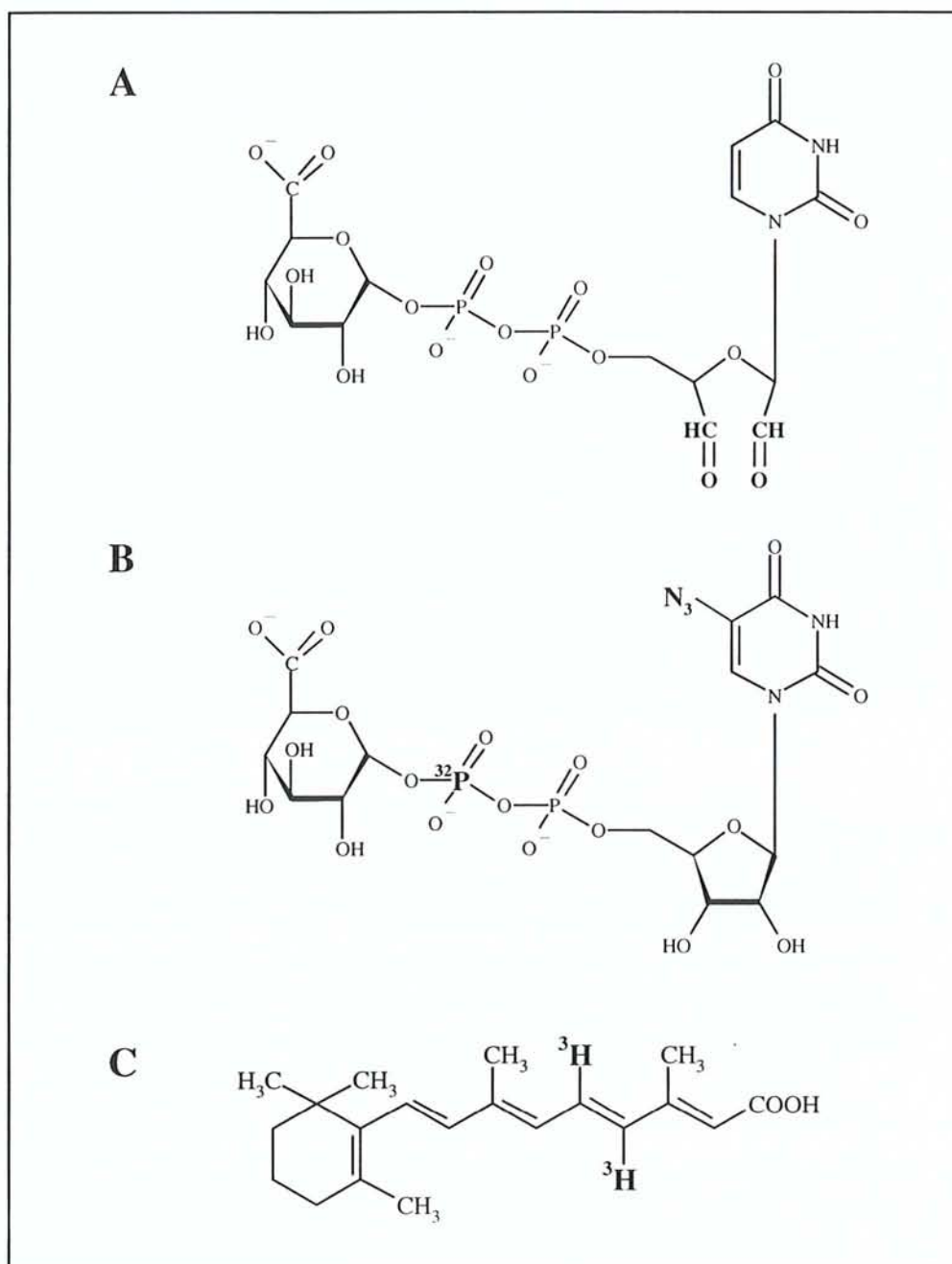


Figure 8. Marqueur d'affinité et sondes photo-activables.

A. *o*-UDPGA.

B. [β-³²P]5N₃UDPGA.

C. [³H]acide rétinique tout-*trans*.

aglycones sur d'autres protéines les acceptant comme substrats, telles que les sulfotransférases (Chen *et al.*, 1999).

II. Métabolisme des acides carboxyliques

De multiples molécules, endogènes et exogènes, possèdent une ou plusieurs fonction(s) carboxyle(s) et sont métabolisées par glucuronoconjugaison sous forme d'acylglucuronides. Quelques unes de ces molécules sont représentées sur la figure 9. Mise à part la fonction carboxyle commune, toutes ces molécules présentent des structures chimiques très diverses, qui conditionnent d'une part leur prise en charge par différentes isoformes d'UGT, et d'autre part, leur réactivité potentielle après glucuronoconjugaison.

La bilirubine (Kuenzle *et al.*, 1966), l'acide rétinoïque tout-*trans* et ses dérivés (Salyers *et al.*, 1993), les acides gras à courte chaîne (Kuhara *et al.*, 1986), les acides biliaires à courte chaîne latérale (Radomska-Pyrek *et al.*, 1986), ou encore certaines hormones thyroïdiennes (thyroxine), sont des composés endogènes à structure carboxylique à l'origine de la formation d'acylglucuronides.

De même, certains xénobiotiques naturels possèdent une ou plusieurs fonction(s) carboxyle(s) et sont glucuronoconjugués sur ces groupements. Pour exemples, le carboxy-tétrahydrocannabinol, dérivé du cannabis (Williams & Moffa, 1980), l'acide nicotinique, l'acide benzoïque présent sous forme libre en quantité non négligeable dans les baies, ou encore les produits issus de la dégradation de l'acide phtalique présents dans certains champignons (*Gibberella fujikuroi*), sont éliminés de l'organisme sous forme d'acylglucuronides (figure 9) (Caldwell, 1985).

De nombreuses classes pharmacologiques comprennent des médicaments à structure carboxylique métabolisés sous forme d'acylglucuronides (figure 9). Ces substances pharmaceutiques peuvent être des antibiotiques comme les quinolones (péfloxacine), des diurétiques (furosémide), des anticonvulsivants (acide valproïque), des hypolipémiants (acide clofibrigue), des antigoutteux (probenécide). Cependant, les AINS constituent la classe majeure de médicaments métabolisés par glucuronoconjugaison.

II.1. Acides carboxyliques exogènes : les AINS

II.1.1. Propriétés physicochimiques, pharmacologiques et pharmacocinétiques des AINS

Les AINS constituent une classe thérapeutique très largement prescrite, en particulier dans le traitement des rhumatismes inflammatoires et dégénératifs (Emery, 1996). Hormis leur effet anti-inflammatoire, leur sont associées des propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-agrégantes plaquettaires. Ils sont répartis en 7 classes en fonction du squelette chimique qui les constitue (tableau 2). En dépit de leur diversité structurale, ils possèdent des propriétés physicochimiques, pharmacologiques et pharmacocinétiques communes.

35

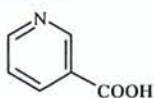
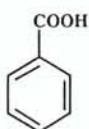
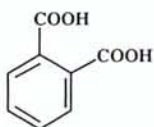
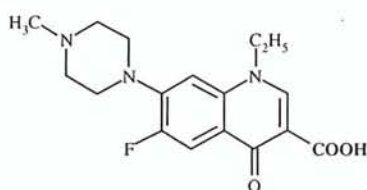
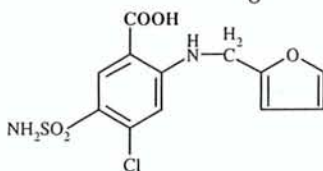
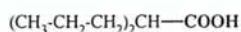
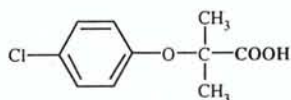
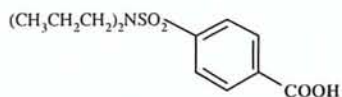
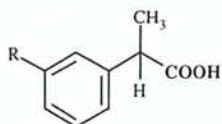
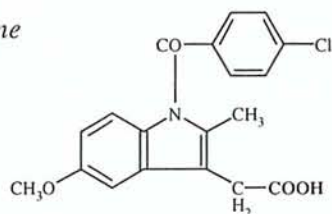
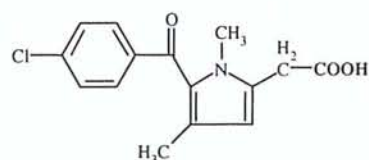
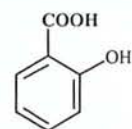
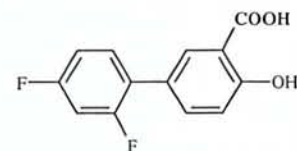
ENOBIOTIQUES NATURELS*Acide nicotinique**Acide benzoïque**Acide phtalique***MEDICAMENTS****ANTIBIOTIQUE***Péfloxacin***DIURETIQUE***Furosémide***ANTICONVULSIVANT***Acide valproïque***HYPOLIPEMIANT***Acide clofibrique***ANTIGOUTTEUX***Probénécide***AINS****Profènes****Indoliques***Indométhacine**Zomépirac***Salicylés***Acide salicylique**Diffunisal*

Figure 9. Structure chimique d'acides carboxyliques
à l'origine de la formation d'acylglycuronides (suite).

Tableau 2. Classification chimique des AINS (liste non exhaustive).

Acides carboxyliques*Acides salicyliques et dérivés*

acide acétylsalicylique (aspirine)
diflunisal

*Acides acétiques**Acides phénylacétiques et apparentés*

diclofénac
ibufénac¹

Acides indolacétiques et apparentés

étodolac
indométacine
sulindac
tolmétine
zomépirac¹

Acides propioniques et apparentés (profènes)

acide tiaprofénique
alminoprofène
bénoxaprofène¹
carprofène¹
fénoprofène
flurbiprofène
ibuprofène
indoprofène
kétoprofène
naproxène
pirprofène¹
suprofène¹

Acides anthraniliques ou fénamates

acide flufénamique¹
acide méfénamique
acide niflumique
acide tolfénamique

Acides énoïques*Pyrazolones*

azapropazone¹
oxyphenbutazone¹
phénylbutazone

Carboxamides du benzothiazine-dioxyde (oxicams)

isoxicam¹
méloxicam
piroxicam

¹Non commercialisé en France ou retiré du marché dans certains pays

Les AINS sont de petites molécules liposolubles de nature hydrophobe. Ce sont des acides organiques faibles (pK_a compris entre 3 et 6) qui se trouvent sous forme anionique à pH physiologique (Deschamps-Labat, 1997).

Parmi les AINS, les dérivés de l'acide 2-phénylpropionique (profènes) ainsi que certains indolés (étodolac, sulindac) présentent la particularité de posséder un atome asymétrique en position α de la fonction acide carboxylique, conférant une chiralité à ces molécules. Ces composés existent alors sous la forme de deux énantiomères de configuration spatiale opposée *R* (rectus) et *S* (sinister) (exemple du kétoprofène, figure 10). L'énantiomère *S* est responsable de l'effet anti-inflammatoire observé *in vivo* (Brune *et al.*, 1991). Cependant, les AINS chiraux sont commercialisés sous forme racémique, à l'exception du naproxène pour lequel seul l'énantiomère *S* est administré.

Les propriétés physicochimiques des AINS conditionnent la distribution de ces médicaments dans l'organisme et par conséquent leur activité pharmacologique et leur métabolisme.

Les mécanismes d'action des AINS, essentiellement périphériques, consistent en une inhibition des cyclo-oxygénases (COX), enzymes membranaires qui catalysent la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Il existe au moins deux isoformes de COX. COX-1, exprimée de façon constitutive, est la forme physiologique impliquée dans l'homéostasie vasculaire, la cytoprotection gastrique, la régulation de l'agrégation plaquettaire, la régulation du flux sanguin rénal et le maintien de la vitesse de filtration glomérulaire. L'inhibition de COX-1 est à l'origine des effets secondaires indésirables liés à l'administration des AINS, qui sont une mauvaise tolérance gastrique et dans une moindre mesure d'un risque d'insuffisance rénale chez les sujets sensibles (Singh *et al.*, 1994 ; Solomon & Gurwitz, 1997). COX-2, au contraire, est inductible par les cytokines pro-inflammatoires. COX-2 intervient dans la réaction inflammatoire par la production de prostaglandines qui, par leurs propriétés vasodilatatrices, pyrogènes et algogènes, sont des médiateurs de l'inflammation (Lee *et al.*, 1992).

Les AINS commercialisés jusqu'à présent inhibent indifféremment les deux isoformes de COX (Meade *et al.*, 1993 ; Mitchell *et al.*, 1993). Ces dernières années, dans le but de limiter les effets secondaires liés à l'administration des AINS, un important effort de recherche pharmacologique a été réalisé pour mettre au point des AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2. Ainsi, les oxicams (isoxicam) sont des AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2. Par ailleurs, ces molécules, contrairement aux autres AINS, ne sont pas des acides carboxyliques et ne sont pas métabolisés par glucuronoconjugaison.

Les AINS, administrés par voie orale, sont rapidement absorbés chez l'homme (Rudy *et al.*, 1998). Comme ils sont liposolubles, leur absorption gastro-intestinale fait intervenir un mécanisme de diffusion passive. L'absorption est quasi-complète et l'effet de premier passage hépatique négligeable, de sorte que la biodisponibilité orale des AINS est supérieure à 80%. Les AINS sont très fortement fixés aux protéines plasmatiques. L'importante liaison à l'albumine

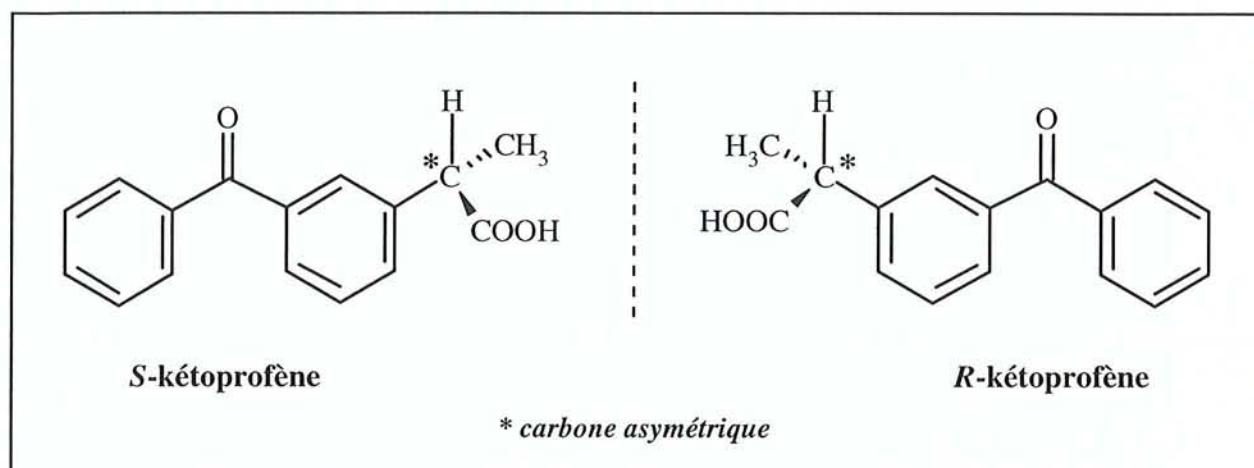


Figure 10. Enantiomères du kétoprofène.

s'accompagne d'un faible volume de distribution et d'une faible clairance totale (Verbeeck *et al.*, 1983). Les AINS et leurs métabolites peuvent être éliminés par voie urinaire et/ou biliaire (King & Dickinson, 1996). L'importance de ces deux voies dépend à la fois du composé (masse molaire) et de l'espèce animale. Chez l'homme, la demi-vie des AINS est relativement courte et ils sont essentiellement excrétés par voie urinaire (Verbeeck *et al.*, 1983).

Enfin, la pharmacocinétique des AINS est fortement influencée par leur métabolisme, particulièrement l'inversion chirale observée pour les profènes et la formation et l'hydrolyse de leurs métabolites glucuronoconjugués (Jamali *et al.*, 1989).

II.1.2. Métabolisme des AINS

Trois voies métaboliques sont impliquées dans la biotransformation des profènes : l'oxydation, l'inversion chirale et principalement la glucuronoconjugaison.

II.1.2.1. Oxydation

Les profènes subissent des réactions d'oxydation catalysées par les P450 (Boelsterli *et al.*, 1995). L'oxydation n'est pas la voie métabolique majeure des profènes mais concerne cependant bon nombre d'entre eux.

L'ibuprofène est principalement métabolisé par oxydation de sa chaîne latérale, conduisant à la formation des deux métabolites hydroxy- et carboxy-ibuprofène (Hamman *et al.*, 1997). L'oxydation du fénoprophène est une réaction importante qui conduit à la formation de 4'-OH-fénoprophène, métabolite qui est ensuite glucuronoconjugué et éliminé dans l'urine (Rubin *et al.*, 1972). Le flurbiprofène subit diverses oxydations aromatiques à l'origine des métabolites 4'-OH-, 3'-OH-4'-OCH₃- et 3', 4'-OH-flurbiprofène (Knadler & Hall, 1989). Le kétoprofène est également substrat des P450 et forme ainsi des métabolites hydroxylés (Populaire *et al.*, 1973).

Les métabolites oxydés peuvent être secondairement glucuronoconjugués et éliminés dans la bile ou l'urine.

II.1.2.2. Inversion chirale

II.1.2.2.1. Mécanisme de l'inversion chirale

L'inversion chirale est une voie métabolique particulière aux profènes. La réaction consiste à convertir l'énantiomère inactif *R* en énantiomère *S* actif. L'inversion réciproque de *S* en *R* est rare. Elle n'a été constatée que pour l'acide 2-phénylpropionique chez le rat (Fournel & Caldwell, 1986) et le chien (Tanaka *et al.*, 1992).

Le mécanisme d'inversion chirale, représenté sur la figure 11, se décompose en trois étapes. La première étape consiste en une thioestérification du profène par le coenzyme A (CoA). Cette réaction est catalysée, en présence d'ATP, par les acyl CoA synthétases ou ligases, localisées dans les microsomes, les mitochondries et les peroxysomes. Ces enzymes se distinguent par leur sélectivité de substrat : acides gras saturés de 10 à 18 carbones et insaturés de 16 à 22 carbones. La

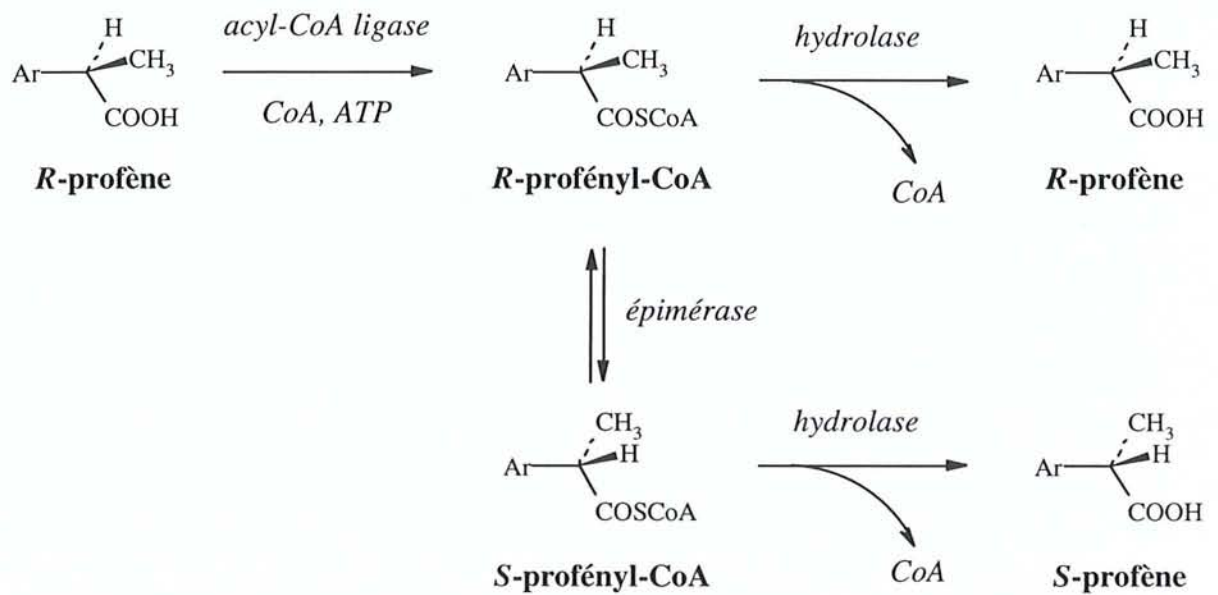


Figure 11. Mécanisme d'inversion chirale des profènes.
(d'après Nakamura et al., 1981)

palmitoyl CoA synthétase semble être l'enzyme impliquée dans cette réaction (Iijima *et al.*, 1996). Cette étape est énantiosélective et ne concerne que l'énantiomère *R* (Knihnicki *et al.*, 1991 ; Tracy & Hall, 1992). La deuxième étape est l'épimérisation de l'acyl CoA. Une 2-arylpropionyl-CoA épimérase, de localisation cytosolique ou mitochondriale, est responsable de cette réaction. Enfin, la dernière étape est l'hydrolyse de l'acyl CoA, sous l'action d'hydrolases microsomales ou mitochondriales, qui libère le CoA et un mélange des deux énantiomères *R* et *S* du profène (Nakamura *et al.*, 1981).

L'inversion chirale est essentiellement hépatique mais d'autres organes sont également concernés comme le rein (Nakamura & Yamaguchi, 1987), l'intestin (Berry & Jamali, 1991), le coeur, les poumons (Hall *et al.*, 1992) et le cerveau.

Ce phénomène d'inversion métabolique est variable en fonction de l'AINS et de l'espèce animale considérés (Muller *et al.*, 1990). Ainsi, contrairement au flurbiprofène (Jamali *et al.*, 1988), l'ibuprofène est inversé chez toutes les espèces étudiées en proportion importante (Chen & Chen, 1994). En ce qui concerne le kétoprofène, 80% de ce profène subit une inversion chirale chez le rat (Foster & Jamali, 1988), mais seulement 10% s'inverse chez l'homme (Rudy *et al.*, 1998).

II.1.2.2.2. Conséquences pharmacologiques et toxicologiques de l'inversion chirale

Les acyl CoA formés par inversion chirale des profènes peuvent être conjugués aux acides aminés ou incorporés dans les lipides membranaires.

La conjugaison aux acides aminés est une réaction catalysée par des enzymes localisées dans la matrice mitochondriale, principalement dans le foie et secondairement dans le rein. Elle conduit à la formation de métabolites inactifs qui sont rapidement excrétés dans l'urine. La conjugaison aux acides aminés intervient avec la plupart des acides carboxyliques mais varie en fonction de l'encombrement stérique du groupement COOH et également de l'espèce étudiée. Ainsi, la conjugaison aux acides aminés constitue non seulement une voie de détoxification mais aussi un moyen de protection des cellules envers les intermédiaires acyl CoA formés.

Les acyl CoA sont également impliqués dans la formation d'acides gras et de triglycérides hybrides susceptibles de s'intégrer dans les tissus adipeux et les membranes biologiques (Fears *et al.*, 1978). Williams *et al.* (1986) ont en effet montré qu'après administration des deux énantiomères d'ibuprofène à des rats, seule la forme *R* est incorporée dans les triglycérides. De même, l'incorporation de fénoprofène dans les triglycérides des membranes d'hépatocytes et d'adipocytes isolés de rat a été montrée seulement pour l'énantiomère *R* (Sallustio *et al.*, 1988). L'accumulation de ces triglycérides hybrides pourrait induire un dysfonctionnement des membranes cellulaires, et pourrait également constituer une voie de stockage dans l'organisme du médicament qui serait libéré progressivement (Hutt & Caldwell, 1983).

Les acyl CoA d'acides carboxyliques endogènes et exogènes ne sont pas présents sous forme libre et sont pris en charge par au moins deux transporteurs : les "acyl CoA binding proteins" (ACBP) et les "fatty acid binding proteins" (FABP). Les ACBP sont des protéines principalement cytosoliques essentiellement présentes dans les érythrocytes et les hépatocytes. Ces

protéines seraient spécifiquement impliquées dans le transport des acyl CoA vers leurs cibles (Rasmussen *et al.*, 1993). Cependant, les FABP responsables du transport des acides gras prennent également en charge les xénobiotiques hydrophobes et les acyl CoA. Les ACBP, en plus de leur fonction de transporteurs, seraient également impliquées dans la création et la régulation d'un pool cytoplasmique d'acyl CoA, dans la protection cellulaire face aux acyl CoA (acyleurs, inhibiteur d'enzymes, détergents membranaires) et dans la protection des acyl CoA vis-à-vis des thioestérases (Gosset *et al.*, 1996).

Les acyl CoA sont des métabolites réactifs capables de se fixer de manière covalente sur les protéines. Ils pourraient ainsi être à l'origine d'une perturbation des fonctions des protéines présentes dans leur environnement. Ainsi, les acyl CoA pourraient inhiber ou séquestrer les acyl CoA synthétases et les épimérases ainsi que les ACBP et les FABP. Schwartzentrüber & Harris (1987) ont montré que les acyl CoA de xénobiotiques diminuent le pool cellulaire de CoASH et d'acétyl CoA, destiné au métabolisme physiologique des acides gras. Enfin, l'inhibition enzymatique par les acyl CoA peut être pharmacologiquement bénéfique. C'est le cas de l'inhibition des COX par le *R*-ibuprofényle CoA (Neupert *et al.*, 1997). L'effet inhibiteur peut également être néfaste. En effet, le *S*-ibuprofényle CoA est un inhibiteur compétitif de l'acyl CoA carboxylase (Kemal & Casida, 1992).

II.1.2.3. Glucuronoconjugaison

Bien que certains profènes puissent subir d'autres types de conjugaison comme la sulfoconjugaison chez l'homme des métabolites hydroxylés du fénoprophène (Rubin *et al.*, 1972) et du flurbiprofène (Knadler & Hall, 1989), ou la glycosylation du pranoprophène chez la souris (Arima & Kato, 1990), la glucuronoconjugaison est la voie principale d'élimination des profènes et de leurs métabolites oxydés (Hayball, 1996).

La glucuronoconjugaison peut être une réaction énantiosélective. L'énantiosélectivité de la réaction dépend de la structure de l'aglycone et de l'espèce animale considérées (El Mouelhi *et al.*, 1987 ; Brunelle & Verbeeck, 1996 ; Maire-Gauthier *et al.*, 1998). Aucune énantiosélectivité de la conjugaison n'a été observée *in vitro* chez l'homme pour le naproxène (El Mouelhi *et al.*, 1987) et le fénoprophène (Volland & Benet, 1991). En revanche, la conjugaison est énantiosélective chez l'homme pour le bénomaxoprophène (Spahn *et al.*, 1989a), l'acide 2-phénylpropionique (Fournel-Gigleux *et al.*, 1988) et l'ibuprofène (Lee *et al.*, 1985). La réaction de glucuronoconjugaison n'est pas énantiosélective vis-à-vis du kétoprophène (Chakir *et al.*, 1994).

II.2. Métabolisme des acides carboxyliques endogènes

II.2.1. Acide rétinoïque tout-trans

De nombreux métabolites de l'acide rétinoïque tout-*trans* ont été détectés dans la bile et l'urine de différentes espèces, après administration de concentrations physiologiques ou pharmacologiques de ce composé (Blaner & Olson, 1994).

Plusieurs voies métaboliques, dont les principales sont représentées sur la figure 12, sont impliquées chez l'homme dans la biotransformation de l'acide rétinoïque tout-*trans*. L'acide rétinoïque tout-*trans* peut être naturellement isomérisé en acide rétinoïque 13-*cis* et en acide rétinoïque 9-*cis*. Les acides rétinoïques tout-*trans* et 13-*cis* sont glucuronoconjugués directement sur la fonction carboxyle terminale, à l'origine de la formation de 1-*O*-acyl- β -D-glucuronides. Les UGT humaines impliquées dans la glucuronoconjugaison de l'acide rétinoïque tout-*trans* sont l'UGT2B7, et dans une moindre mesure, l'UGT1A9. Les acides rétinoïques tout-*trans* et 13-*cis* subissent également deux oxydations successives du groupement cyclohexenyl en position 4, conduisant à la formation des acides 4-hydroxy-rétinoïque et 4-oxo-rétinoïque tout-*trans* et 13-*cis*. L'acide rétinoïque tout-*trans* peut également être oxydé en acide 5,6-époxy-rétinoïque tout-*trans*. Les réactions d'oxydation sont catalysées par le P450 2C8 humain. Les métabolites hydroxylés peuvent être secondairement glucuronoconjugués. Ces métabolites sont finalement excrétés dans la bile ou l'urine (Salyers *et al.*, 1993 ; Sass *et al.*, 1994).

11.2.2. Acide lithocholique

Les acides biliaires proviennent de la dégradation du cholestérol par une voie comportant plusieurs hydroxylations et oxydations, une isomérisation et une réduction de la double liaison du cholestérol. Les acides biliaires ainsi synthétisés dans les cellules polygonales du foie, passent par les canaux hépatiques et cystiques pour être mis en réserve dans la vésicule biliaire sous forme de sels biliaires. Dans la bile humaine, on trouve principalement quatre acides biliaires : l'acide cholique, la variété prédominante, à côté des acides désoxycholique, chénodésoxycholique et lithocholique. L'acide cholique est souvent conjugué à la taurine et à la glycine, respectivement sous forme d'acide taurocholique et glycocholique. Ces deux sels biliaires majeurs, de part leur caractère amphiphatique (extrémité polaire soluble dans les solutions aqueuses et groupement stérol non polaire s'entourant de lipides hydrophobes) sont des détergents efficaces.

L'acide lithocholique subit deux voies métaboliques (figure 13). La glucuronoconjugaison de la fonction hydroxyle en position 3 α conduit à la formation d'un 3-*O*-éther- β -D-glucuronide à l'origine de cholestases (Takikawa *et al.*, 1993). La glucuronoconjugaison de la fonction carboxyle terminale est, quant à elle, à l'origine de la formation d'un 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide (Panfil *et al.*, 1992). L'acide lithocholique est également hydroxylé en position 6 α par le P450 3A4 pour former l'acide hyodéoxycholique. L'acide hyodéoxycholique est glucuronoconjugué sur les fonctions hydroxyles en position 3 α , et majoritairement en position 6 α , ainsi que sur la fonction carboxyle terminale. L'UGT2B4 est l'isoforme impliquée dans la glucuronoconjugaison de l'acide hyodéoxycholique en position 6 α (Pillot *et al.*, 1993).

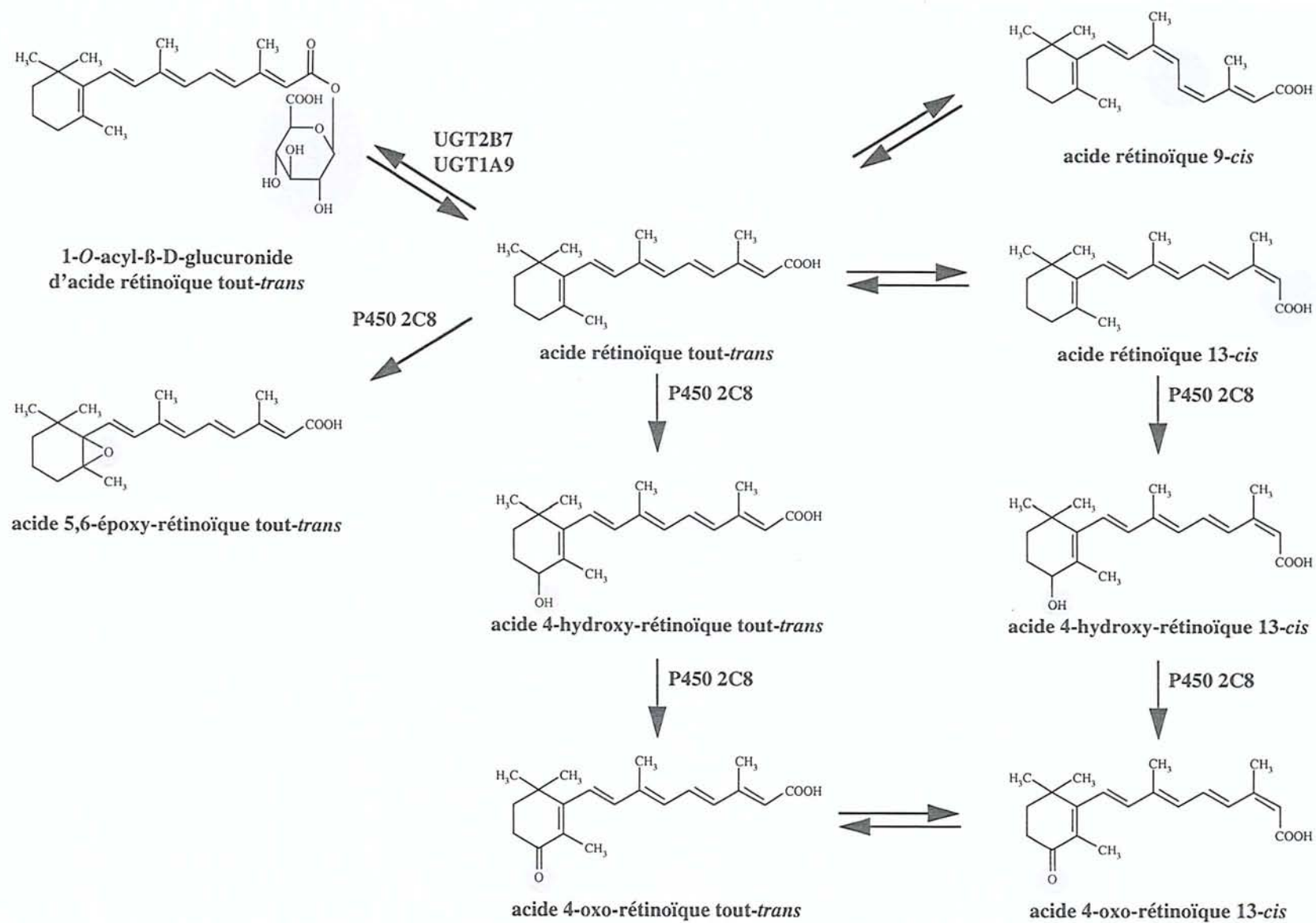


Figure 12. Principales voies métaboliques de l'acide rétinolique tout-trans chez l'homme.

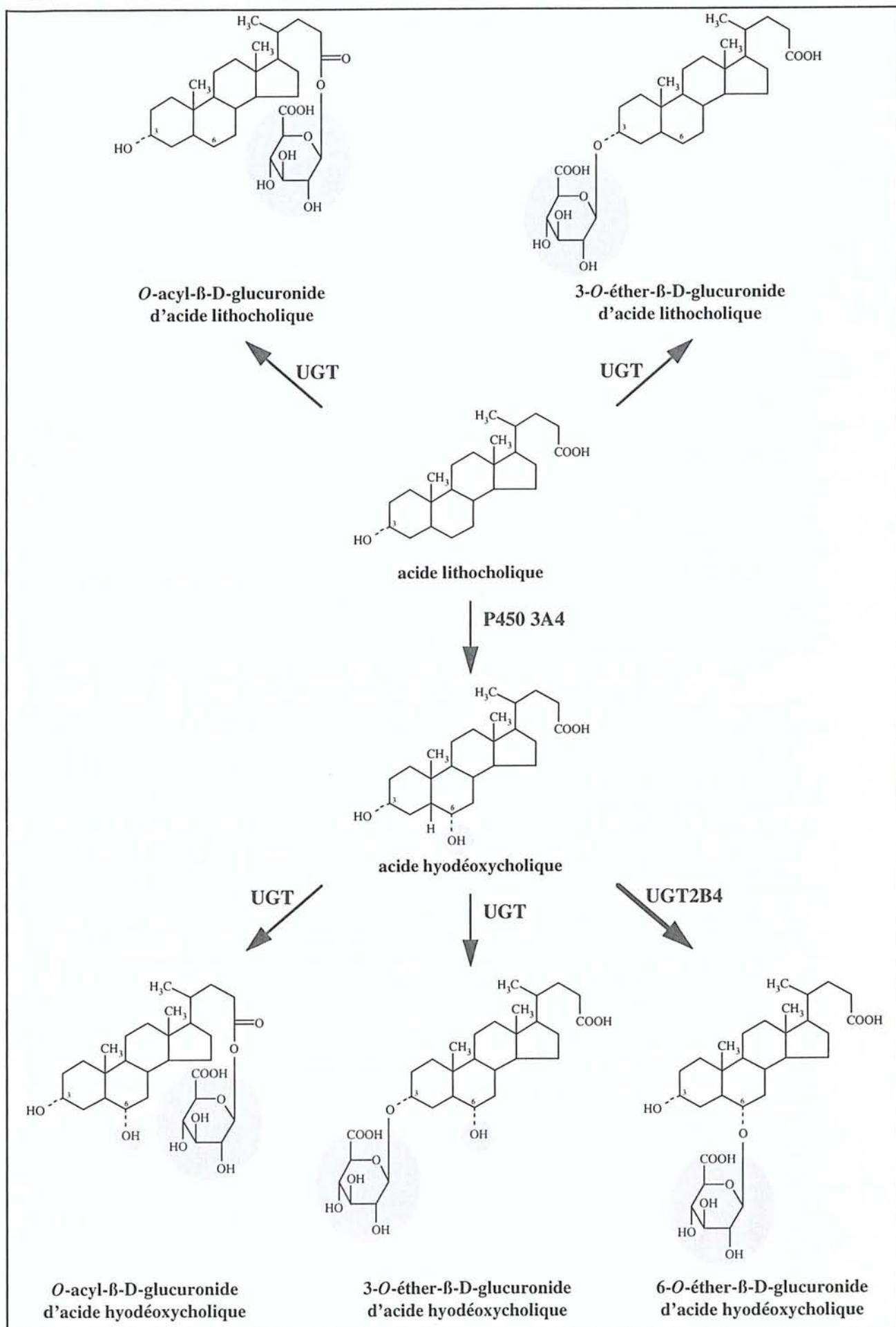


Figure 13. Métabolisme de l'acide lithocholique.

11.2.3. Acides gras

Les acides gras subissent de nombreuses réactions de biotransformation dans l'organisme (élongation et oxydation de la chaîne carbonée). Les acides gras libres doivent être activés en thioesters d'acyl CoA par des acyl CoA synthétases, avant d'être dégradés principalement par la voie de la β -oxydation. Ils peuvent cependant être métabolisés sous forme de glucuronides lorsque la voie classique de métabolisation par β -oxydation est saturée ou défaillante (Duran *et al.*, 1985 ; Kuhara *et al.*, 1986).

Les acyl CoA sont une forme intermédiaire activée du métabolisme des acides gras. Les acyl CoA ont la propriété de se lier de manière irréversible aux protéines, provoquant ainsi un changement des propriétés physicochimiques de ces protéines. Ils pourraient ainsi moduler la fonction de récepteurs (récepteur des hormones thyroïdiennes) ou l'activité de protéines enzymatiques (Na^+ -ATPase, K^+ -ATPase, protéine kinase C) (Krcmery & Zakim, 1993 ; Yamashita *et al.*, 1995). De plus, différents états pathologiques, nutritionnels et métaboliques (diabète, abus d'alcool, régime alimentaire riche en graisses...), caractérisés par une augmentation d'acyl CoA, s'accompagnent d'une diminution de la glucuronoconjugaison. Plusieurs mécanismes sont proposés dans la littérature pour expliquer cette relation inverse. Les acyl CoA seraient directement impliqués par fixation sur les UGT, modifiant ainsi la conformation active de ces enzymes. Les acyl CoA pourraient également inhiber la glucuronoconjugaison, qui nécessite la présence de cations divalents, soit en mobilisant la concentration de calcium intracellulaire (Csala *et al.*, 1996), soit par leur action détergente.

11.3. Isoformes d'UGT impliquées dans la glucuronoconjugaison des acides carboxyliques

Le développement de lignées cellulaires a permis l'identification et la caractérisation des isoformes d'UGT impliquées dans la conjugaison des acides carboxyliques. Les différentes isoformes d'UGT impliquées dans la glucuronoconjugaison des acides carboxyliques exogènes et endogènes sont présentées dans le tableau 3.

Parmi les UGT de la famille 1, l'UGT1A1 est l'isoforme humaine responsable de la glucuronoconjugaison de la bilirubine. La bilirubine possède deux fonctions carboxyles. Elle est métabolisée par cette isoforme sur l'une ou les deux fonctions sous forme de mono ou diacylglucuronides de bilirubine (Ritter *et al.*, 1991). L'UGT1A6 humaine, principalement responsable de la glucuronoconjugaison des phénols plans (1-naphtol, 2-naphtol, 4-méthylombelliférone (4MO)), est capable de métaboliser le *S*-naproxène (Ebner & Burchell, 1993). L'UGT1A9 est une isoforme humaine qui présente une spécificité de substrat assez large. Cette isoforme métabolise *in vitro* des composés structuralement différents comme les phénols encombrés, les anthraquinones, les flavonoïdes, des composés hydroxylés aromatiques et divers médicaments à structure carboxylique. Les AINS tels que le kétoprofène, le naproxène, l'ibuprofène, le fénoprofène, le diflunisal ou encore les anticonvulsivants comme l'acide

Tableau 3. Isoformes d'UGT impliquées dans la conjugaison des acides carboxyliques.

		FAMILLE 1				FAMILLE 2	
		UGT1A1	UGT1A3	UGT1A6	UGT1A9	UGT2B1	UGT2B7
				(homme)		(rat)	(homme)
MEDICAMENTS							
AINS							
Profènes							
	<i>RS-Kétoprofène</i>	-	++	-	+	++++	++
	<i>S-Naproxène</i>	-	++	++	+	++++	++
Salicylés							
	<i>Acide salicylique</i>	-	?	-	-	+	-
	<i>Diffunisal</i>	-	?	-	+	+	+
ANTICONVULSIVANTS							
	<i>Acide valproïque</i>	-	+	-	+	++++	++
HYPOLIPEMIANTS							
	<i>Acide clofibrique</i>	-	+	-	?	+++	+
COMPOSES ENDOGENES							
BILIRUBINE		++++	-	-	-	-	-
RETINOÏDES							
	<i>Acide rétinoïque tout-trans</i>	-	?	-	+	-	+++
ACIDES GRAS							
	<i>Acide octanoïque</i>	-	?	-	?	++++	?
	<i>Acide dodécanoïque</i>	-	?	-	+	++++	?
	<i>Acide linoléique</i>	-	?	-	?	++++	?
ACIDES BILIAIRES							
	<i>Acide lithocholique</i>	-	?	-	?	++	?
	<i>Acide hyodéoxycholique</i>	-	?	-	?	-	++++
HORMONES THYROÏDIENNES							
	<i>L-Thyroxine</i>	-	?	-	-	+	?
	<i>3, 3',5-Triiodothyronine</i>	-	?	-	-	-	?

? Substrat non testé

+ Activité proportionnelle au nombre de +

valproïque sont pris en charge par l'UGT1A9 (Ebner & Burchell, 1993). Enfin, l'UGT1A3, isoforme humaine impliquée surtout dans la conjugaison de certains œstrogènes (estrone et 2-hydroxyestrone) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (benzo[a]pyrène et métabolites), métabolise également des acides carboxyliques d'origine endogène et exogène. En effet, les acides gras à longue chaîne (acide dodécanoïque) ou encore certains AINS sont glucuronoconjugués par l'UGT1A3 (Mojarrabi *et al.*, 1996 ; Green *et al.*, 1998).

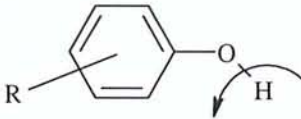
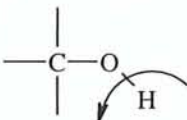
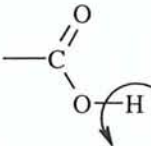
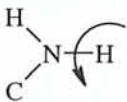
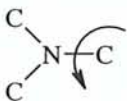
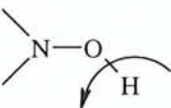
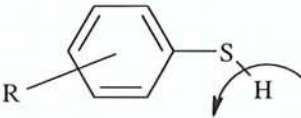
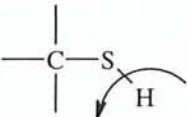
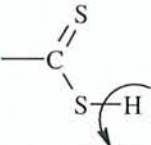
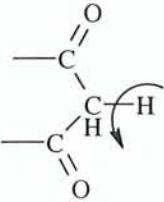
Les UGT de la famille 2 sont également impliquées dans la conjugaison des acides carboxyliques. Au sein de cette famille, une isoforme murine, l'UGT2B1 (Pritchard *et al.*, 1994) et une isoforme humaine, l'UGT2B7 (Jin *et al.*, 1993), sont capables de conjuguer de nombreux acides carboxyliques ainsi que des composés hydroxylés (opioïdes). L'UGT2B1, exprimée de façon stable dans les cellules V79, accepte des substrats avec une fonction carboxyle tant exogènes (AINS tels que le kétoprofène, le naproxène, l'ibuprofène, le diflunisal, l'acide salicylique, mais aussi l'acide valproïque et l'acide clofibrique) qu'endogènes (acides biliaires comme l'acide lithocholique, acides gras saturés à courte chaîne, acides gras insaturés à longue chaîne). Cependant, la bilirubine et l'acide rétinolique tout-*trans* ne sont pas pris en charge par l'UGT2B1 (Pritchard *et al.*, 1994). L'UGT2B7, exprimée dans les cellules COS, conjugue les médicaments à structure carboxylique (profènes, acide valproïque, acide clofibrique), l'acide rétinolique tout-*trans* et l'androstérone (Jin *et al.*, 1993). La glucuronoconjugaison par l'UGT2B1 et l'UGT2B7 est stéréosélective pour certains dérivés de l'acide 2-phénylpropionique. En effet, pour les deux enzymes, la conjugaison du *S*-ibuprofène est supérieure à celle du *R* alors que le métabolisme du kétoprofène, du naproxène et de l'acide 2-phénylpropionique n'est pas énantiosélectif (Jin *et al.*, 1993 ; Pritchard *et al.*, 1994).

III. Propriétés des glucuronides

Les glucuronides sont classés en quatre types selon la fonction chimique nucléophile impliquée dans leur formation. Ce sont les *O*-, *S*-, *N*- et *C*-glucuronides (tableau 4) (Mulder *et al.*, 1990). La grande majorité des glucuronides est constituée par les *O*-glucuronides. Les *S*- et les *N*-glucuronides sont moins nombreux et les *C*-glucuronides relativement rares. Les glucuronides ont un caractère anionique et sont plus hydrophiles que l'aglycone dont ils dérivent. A l'exception des acylglucuronides, ce sont des métabolites généralement stables et inertes dans les conditions physiologiques. Ils permettent l'élimination rapide d'un grand nombre de composés dans les liquides biologiques (bile et urine) (Dutton, 1980). Les glucuronides excrétés dans la bile peuvent être hydrolysés par les β -glucuronidases bactériennes de l'intestin et libérer ainsi l'aglycone parent. L'aglycone peut alors être réabsorbé au niveau de l'intestin, ce qui prolonge son temps de séjour dans l'organisme et modifie sa biodisponibilité (cycle entéro-hépatique).

La glucuronoconjugaison conduit généralement à la formation de glucuronides inactifs. Cependant, certains glucuronides sont des métabolites biologiquement actifs (Kroemer & Klotz, 1992).

bleau 4. Fonctions chimiques pouvant être glucuronoconjuguées.

Type de glucuronide	Fonction	Exemples
O-glucuronides		
O-étherglucuronides		phénol <i>4-méthylumbelliférone</i> <i>1-naphtol</i> <i>2-naphtol</i> <i>4-nitrophénol</i> <i>4-hydroxybiphényle</i> <i>morphine</i> <i>codéine</i>
		alcool <i>menthol</i> <i>chloramphénicol</i> <i>oxazépam</i> <i>androgènes</i>
O-acylglucuronides		acide carboxylique <i>profènes</i> <i>acide clofibrique</i> <i>acide valproïque</i> <i>acide rétinoïque</i> <i>acides biliaires</i> <i>acides gras</i> <i>bilirubine</i>
N-glucuronides		
		amines primaires
		amines tertiaires
		hydroxylamine
S-glucuronides		
		thiophénol
		thiol
		acide carbamique
C-glucuronides		
		1,3-dicarbonyle

III.1. Glucuronides pharmacologiquement actifs

Nous présenterons deux exemples de glucuronides pharmacologiquement actifs : le 6-*O*-glucuronide de morphine et de codéine et le 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide de l'acide rétinoïque tout-*trans*.

La morphine et la codéine, dont les structures chimiques sont représentées sur la figure 14, sont des analgésiques utilisés en thérapeutique chez l'homme. La morphine porte deux fonctions hydroxyle en positions 3 et 6. Ce composé est glucuronoconjugué dans le foie humain sur ces deux groupements fonctionnels. Cette biotransformation conduit à la formation de deux glucuronides : le 3-*O*-glucuronide de morphine, qui est le métabolite principal, et le 6-*O*-glucuronide de morphine (Coughtrie *et al.*, 1989). Le 3-*O*-glucuronide de morphine est pharmacologiquement inactif. Il pourrait être impliqué dans la potentialisation de certains effets indésirables (effets hyperglycémiques et neuro-endocriniens) liés à l'administration de la morphine (Hashigushi *et al.*, 1995). Au contraire, le 6-*O*-glucuronide de morphine présente une affinité supérieure pour les récepteurs opioïdes et une activité analgésique 650 fois plus importante que la morphine (Frances *et al.*, 1990 ; Christrup, 1997). De même, le 6-*O*-glucuronide de codéine est pharmacologiquement plus actif que la codéine (Srinivasan *et al.*, 1996).

L'acide rétinoïque tout-*trans* et les dérivés de la vitamine A, ainsi que les molécules synthétiques structuralement apparentées (rétinoïdes), sont utilisés dans le traitement de certains cancers et d'autres pathologies (acné, psoriasis) chez l'homme (Tallman & Wiernick, 1992). Leur mécanisme d'action comme modulateurs de l'expression génique repose sur leur fixation à des récepteurs nucléaires ("retinoic acid receptor" (RAR), "retinoic acid X receptor" (RXR)), qui appartiennent à la superfamille des récepteurs stéroïdiens, capables de se fixer à des éléments de réponse présents sur les parties 5' régulatrices de nombreux gènes (Lohnes *et al.*, 1992). Utilisés seuls ou en association avec d'autres médicaments, les rétinoïdes permettent la rémission complète des leucémies promyélocyaires aiguës (Lavau & Dejean, 1994 ; Agadir *et al.*, 1995) et sont également indiqués dans le traitement de cancers tels que les leucémies myéloïdes chroniques, les cancers de la peau et du sein. Toutefois, leur utilisation s'accompagne de réactions indésirables variées (photosensibilisation, irritation des muqueuses, états dépressifs), voire d'une toxicité (atteintes hépatiques, tératogénicité) (Tallman & Wiernick, 1992). L'accumulation des rétinoïdes dans les lipides prolonge la durée de vie de ces molécules dans l'organisme et accentuent ainsi leurs effets secondaires à long terme. Une des voies métaboliques de l'acide rétinoïque tout-*trans* est la glucuronoconjugaison de la fonction carboxyle terminale, à l'origine de la formation du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* (Salyers *et al.*, 1993). Ce métabolite posséderait des propriétés thérapeutiques équivalentes à celles de l'acide rétinoïque tout-*trans* (Miller & Deluca, 1986 ; Janick-Bruckner *et al.*, 1991 ; Mehta *et al.*, 1991), mais sans les effets indésirables. En effet, du fait de leurs propriétés hydrophiles, les glucuronides de rétinoïdes ne traversent que très faiblement la barrière placentaire et ne sont donc pas tératogènes (Creech Kraft *et al.*, 1991). De plus, ils sont rapidement éliminés dans la bile et ne s'accumulent donc pas dans les lipides.

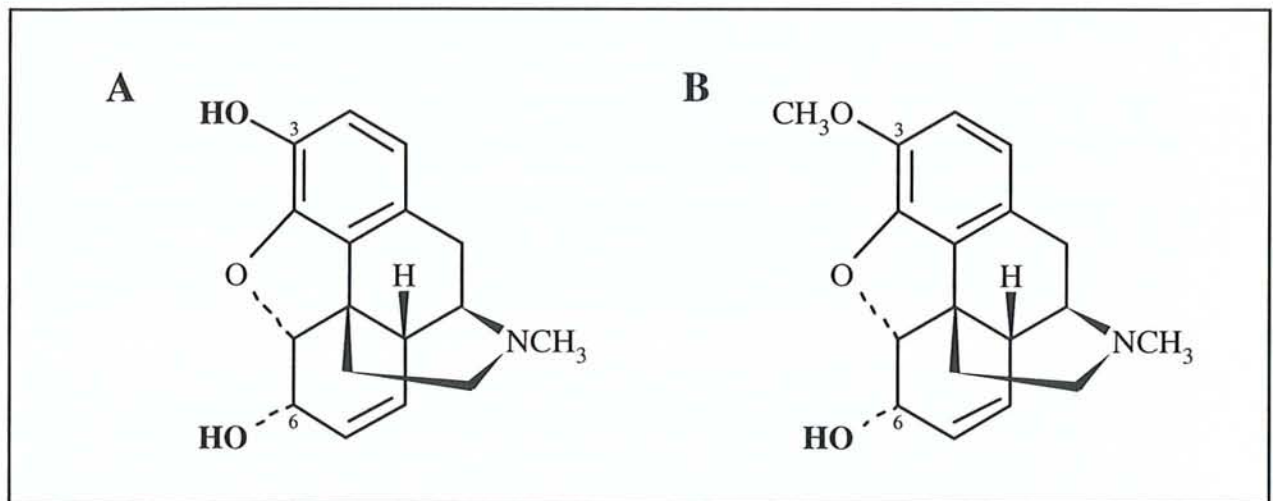


Figure 14. Structure chimique de la morphine (A) et de la codéine (B).

D'autres exemples de glucuronides actifs ont été mis en évidence : les glucuronides de digitoxine et digoxine ont un effet inotrope (Scholz & Schmitz, 1984) et les glucuronide de fluoro-uracyle (Arakawa *et al.*, 1981) et de doxorubicine (Murdter *et al.*, 1997) ont un effet anti-tumoral.

La glucuronoconjugaison peut être également responsable de la formation de glucuronides réactifs, impliqués dans des phénomènes potentiellement toxiques et/ou immuno-allergiques. Ces glucuronides sont les acylglucuronides.

III.2. Réactivité des acylglucuronides

Les 1-*O*-acyl- β -D-glucuronides sont des métabolites instables qui peuvent être dégradés par hydrolyse et par réarrangements intramoléculaires dans les conditions physiologiques de pH et de température *in vitro* et *in vivo*. Ils peuvent également se lier de manière covalente aux protéines plasmatiques et tissulaires (formation d'adduits). Les mécanismes impliqués dans ces phénomènes sont représentés sur la figure 15.

III.2.1. Dégradation

III.2.1.1. Hydrolyse

L'hydrolyse d'un acylglucuronide conduit à la libération directe de l'aglycone. Cette réaction peut être chimique ou enzymatique. L'hydrolyse chimique est spontanée dans les conditions physiologiques de pH et de température. Elle augmente cependant avec le temps et est favorisée par un pH alcalin et une température élevée (Smith *et al.*, 1985). L'hydrolyse enzymatique peut être catalysée par des protéines tissulaires (β -glucuronidases ou estérases) ou plasmatiques (albumine).

La β -glucuronidase est une enzyme principalement responsable de la dégradation des acylglucuronides. La β -glucuronidase humaine est une protéine tétramérique de 77 kDa, largement représentée dans de nombreux tissus de l'organisme, le foie en particulier (Sperker *et al.*, 1997). L'activité catalytique de la β -glucuronidase est dépendante du pH (pH optimal entre 4 et 5, Wakabayashi *et al.*, 1970) et de la concentration en ions Ca^{2+} (Sokolove *et al.*, 1984). Son rôle physiologique est encore mal connu mais elle pourrait cependant permettre la libération d'hormones stéroïdiennes actives à partir du pool d'hormones glucuronoconjuguées (Brunelle & Verbeeck, 1993). L'activité estérasique de la β -glucuronidase, particulièrement importante à pH acide, nécessite l'utilisation systématique d'un inhibiteur, l'acide 1,4-lactone D-saccharique (saccharonolactone), lors de la biosynthèse enzymatique ou de l'étude *in vitro* des acylglucuronides.

In vitro, la β -glucuronidase hépatique humaine est active vis-à-vis de nombreux acylglucuronides. Cette activité estérasique varie en fonction de l'espèce animale, de la distribution et de l'affinité de l'enzyme dans les tissus (Brunelle & Verbeeck, 1996). L'activité estérasique de la β -glucuronidase peut être stéréosélective ou non. Knadler & Hall (1991) ont étudié l'hydrolyse

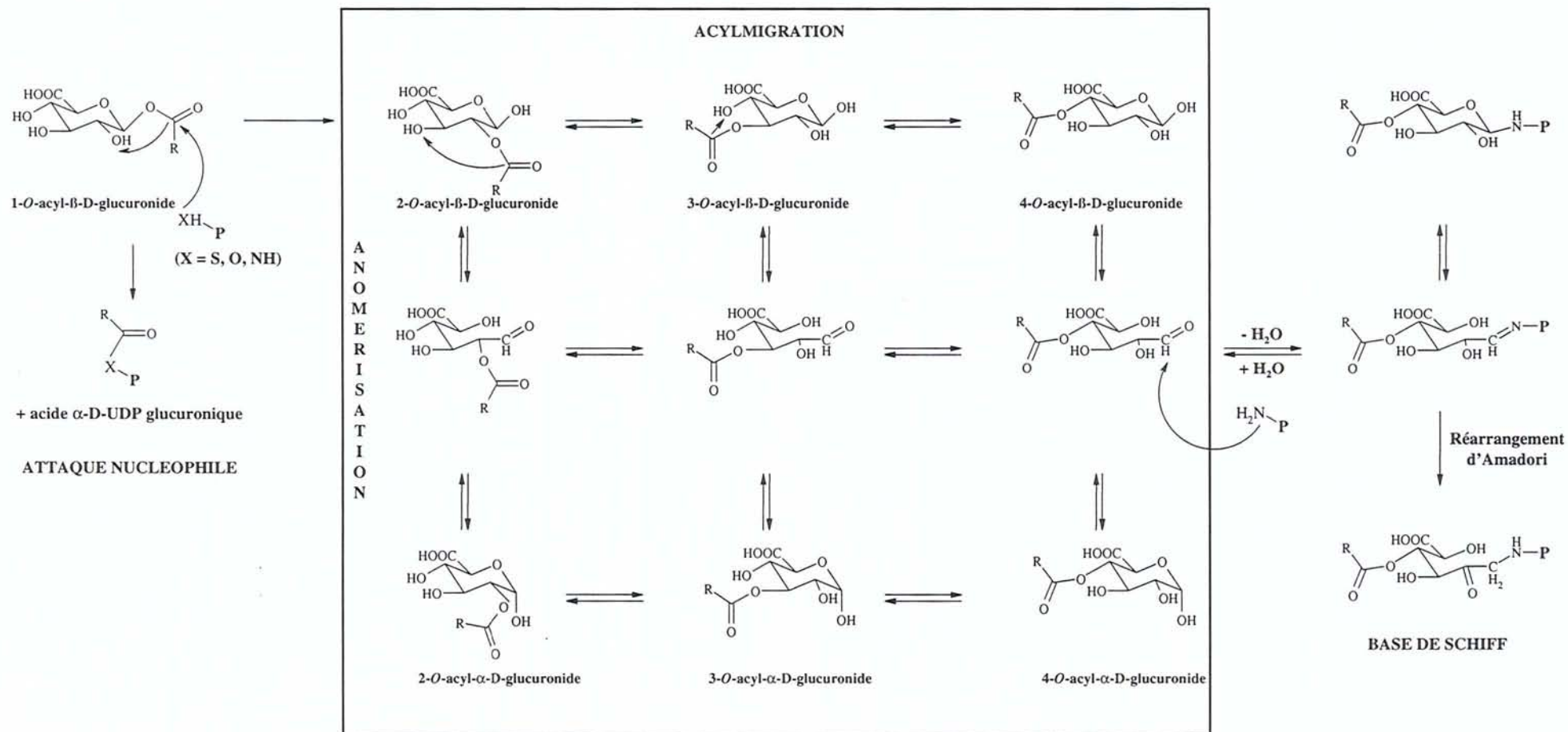


Figure 15. Réactivité des acylglucuronides.

Les acylglucuronides peuvent subir des réarrangements intramoléculaires (acylmigration et anomérisation) et peuvent former des adduits en se liant de manière covalente aux protéines (P) selon un mécanisme d'attaque nucléophile ou de base de Schiff.

des glucuronides du flurbiprofène et ont montré qu'une estérase d'origine porcine favorisait l'hydrolyse du *R*, alors que la β -glucuronidase ne faisait aucune distinction entre les deux diastéréoisomères.

In vivo, l'activité hydrolytique de la β -glucuronidase a été montrée dans le foie de rat perfusé avec le glucuronide de diflunisal (Wang & Dickinson, 1998) et dans l'intestin de rat vis-à-vis de glucuronide d'acide valproïque (Dickinson *et al.*, 1985).

L'albumine serait la protéine essentiellement responsable de l'hydrolyse des acylglucuronides dans le plasma *in vivo* (Knadler & Hall, 1991). Cette activité estérasique s'exerce vis-à-vis des glucuronides du fénoprophène (Volland *et al.*, 1991), du flurbiprofène (Knadler & Hall, 1991), de l'étodolac (Smith *et al.*, 1992) ou du kétoprophène (Hayball *et al.*, 1992 ; Dubois-Presle *et al.*, 1995). A l'inverse, l'albumine humaine diminue la dégradation des glucuronides de la tolmétine, alors que l'albumine bovine, dans les mêmes conditions, l'accélère (Munafo *et al.*, 1990 ; Ojingwa *et al.*, 1994a). De même, la demi-vie apparente des glucuronides d'ibuprofène et d'ibufénac augmente en présence d'albumine humaine (Castillo & Smith, 1995). Plus curieusement, l'albumine humaine augmente la stabilité du glucuronide de *R*-carprofène, alors qu'elle diminue celle du *S* (Georges *et al.*, 1999a). L'activité estérasique de l'albumine peut être énantiosélective. L'albumine humaine hydrolyse préférentiellement le *S*-glucuronide de carprofène (Georges *et al.*, 1999a) et de flurbiprofène (Knadler & Hall, 1991), alors qu'à l'inverse le *R*-naproxène est plus rapidement hydrolysé *in vivo* et *in vitro* (Iwaki *et al.*, 1995) et que le *R*-kétoprophène est un meilleur substrat que son diastéréoisomère (Dubois-Presle *et al.*, 1995). Par contre, aucune stéréosélectivité n'est constatée pour le fénoprophène (Volland *et al.*, 1991).

En conclusion, en dehors de la nature même de l'aglycone, la stabilité des acylglucuronides dépend fortement du pH, de la température et de la composition du milieu, avec un maximum de stabilité à pH 2-4, à basse température et en présence d'inhibiteurs des enzymes hydrolytiques.

III.2.1.2. Réarrangements intramoléculaires (acylmigration)

L'acylmigration des acylglucuronides existe en raison de la présence conjointe d'une liaison ester et de groupements hydroxyles sur le cycle glucuronique. Le radical acyl (aglycone), initialement en position C₁, migre sur les positions C₂, C₃ et C₄ (figure 15). La réaction aboutit à la formation d'isomères de position 2-, 3- et 4-*O*-acyl- β -D-glucuronides. Si les migrations de C₂ à C₃ et de C₃ à C₄ sont réversibles, une barrière de haute énergie empêche le retour à la position C₁ à partir des isomères de position. De plus, la libération du C₁ permet une ouverture transitoire du cycle pyranose, et son interconversion dans les configurations α ou β (anomérisation, figure 15). Les deux anomères existent à l'équilibre, contrairement à la forme initiale, bloquée en position β . Les isomères de position sont insensibles à l'action de la β -glucuronidase mais peuvent être hydrolysés par voie chimique ou sous l'action d'estérases (Spahn-Langguth & Benet, 1992).

III.2.1.3. Conséquences pharmacologiques de la dégradation des acylglucuronides

L'hydrolyse d'un acylglucuronide peut diminuer la clairance plasmatique apparente du médicament et modifier sa pharmacocinétique. Ce phénomène a été montré par exemple pour le kétoprofène (Verbeeck *et al.*, 1984) chez l'homme et pour l'acide salicylique (Liu *et al.*, 1996) chez le rat. C'est l'hypothèse du "cycle futile" qui permet d'expliquer ce phénomène. Ce cycle futile consiste en une libération du médicament par hydrolyse de son glucuronide et provoque sa réabsorption au niveau de l'intestin. Ainsi, le médicament subit, avant d'être éliminé, un cycle de conjugaison et déconjugaison dont l'équilibre influence sa clairance plasmatique (Meffin *et al.*, 1983). Chez les sujets sains, les glucuronides des AINS sont rapidement excrétés par les reins et sont ainsi peu susceptibles d'être dégradés. En revanche, en cas d'insuffisance rénale pathologique ou liée à l'âge, l'accumulation des glucuronoconjugués dans le plasma augmente les risques d'hydrolyse des métabolites, ainsi que la durée de vie du médicament dans l'organisme. La co-administration de probénécide, qui diminue l'excrétion tubulaire, et d'un AINS peut entraîner l'accumulation des glucuronides dans l'organisme et favoriser le cycle futile (Spahn *et al.*, 1989b). Par exemple, l'administration de probénécide diminue chez l'homme de 72% la clairance plasmatique du zomépirac et augmente de trois fois environ la concentration de son acylglucuronide (Smith *et al.*, 1985).

L'hydrolyse des acylglucuronides dans l'intestin sous l'action des β -glucuronidases bactériennes conduit à l'existence d'un cycle entéro-hépatique. La formation d'isomères de position résistants à l'action de la β -glucuronidase pourrait augmenter la clairance plasmatique du médicament (Ruelius *et al.*, 1985). En effet, les isomères de position, qui ne sont pas hydrolysés dans la flore intestinale, empêchent la circulation entéro-hépatique du médicament. A titre d'exemple, seul le *S*-carprofène subit un cycle entéro-hépatique chez le chien. L'absence de ce phénomène pour l'énantiomère *R* peut s'expliquer par la formation d'isomères de position résistants à l'action des β -glucuronidases pour cet énantiomère (Priymenko *et al.*, 1998).

Enfin, l'hydrolyse des AINS chiraux est souvent stéréosélective et peut ainsi modifier le rapport énantiomérique du médicament libéré dans l'organisme. Ainsi, l'hydrolyse préférentielle de l'énantiomère *S*, qui est l'énantiomère pharmacologiquement actif, peut ainsi accentuer l'action pharmacologique du médicament *in vivo* (Hayball, 1995 ; Chen & Chen, 1994).

III.2.2. Fixation irréversible sur les protéines : formation d'adduits

III.2.2.1. Mécanismes de la formation des adduits

Deux mécanismes chimiques de ces réactions sont proposés dans la littérature : le mécanisme de substitution ou déplacement nucléophile et le mécanisme de la base de Schiff (figure 15).

Dans le premier mécanisme, la fixation se fait par attaque nucléophile par un groupement nucléophile de la protéine sur le motif acide glucuronique du conjugué. Les groupements nucléophiles impliqués dans ce mécanisme seraient les groupements SH des cystéines (Van

Breemen & Fenselau, 1985), OH des tyrosines (Ruelius *et al.*, 1986) ou des sérines, et NH₂ des lysines (Van Breemen & Fenselau, 1985). Dans ce mécanisme, la partie acide glucuronique agit comme un bon groupement partant, activant ainsi la molécule parente. A la fin de la réaction, seul le médicament (sans l'acide glucuronique) est fixé de façon irréversible sur la protéine.

Le deuxième mécanisme, proposé par Smith *et al.* (1986), nécessite une première étape d'acylmigration du composé de la position 1 vers les positions 2, 3 et 4 de l'acide glucuronique. La libération du C₁ permet l'ouverture transitoire du cycle pyranose de l'acide glucuronique pour permettre le passage d'un anomère à l'autre. La liaison peut alors s'effectuer par condensation entre la fonction aldéhyde libre d'un des isomères dans sa forme ouverte et une fonction amine de la protéine (NH₂ des lysines ou extrémité N-terminale), aboutissant à la formation d'une imine (base de Schiff). Un réarrangement peut alors conduire à une aminocétone stable (Smith *et al.*, 1990). Le produit final lié de façon irréversible contient toujours l'acide glucuronique qui constitue le lien entre la protéine et l'aglycone. L'utilisation de trappeurs d'imine (cyanure de sodium ou cyanoborhydrure de sodium) permet de donner des informations sur les mécanismes impliqués dans la formation d'adduits. En effet, le cyanure de sodium piège les imines en formant des aminonitriles et le cyanoborhydrure de sodium les stabilise en les réduisant en amines (figure 16) (Smith *et al.*, 1990). Ainsi, ces agents, en capturant les imines, augmentent la production d'adduits *via* le mécanisme de la base de Schiff, et/ou stabilisent les adduits formés par ce mécanisme.

Un autre type d'adduits, récemment mis en évidence, fixe uniquement l'acide glucuronique sur la protéine sans l'aglycone. Le mécanisme impliqué dans la formation de ces adduits, analogue au mécanisme de la base de Schiff, est la glycation des protéines par l'acide glucuronique (Georges *et al.*, 1999b).

III.2.2.2. Cibles protéiques de la formation d'adduits

La formation d'adduits sur les protéines plasmatiques et tissulaires a fait l'objet de multiples études, réalisées *in vitro* et *in vivo*, chez l'homme et l'animal. Les acylglucuronides de toutes les classes d'AINS ont été testés : glucuronides de kétoprofène, carprofène, naproxène, ibuprofène, fénoprofène, suprofène, bénomaxoprofène, diflunisal, étodolac, tolmétine, zomépirac... La formation d'adduits avec des acylglucuronides d'hypolipémiants (acide clofibrique), d'anticonvulsivants (acide valproïque), d'antigoutteux (probenécide) a également été étudiée. Le 1-O-acyl-β-D-glucuronide est généralement l'isomère de position utilisé mais les isomères 2-, 3-, ou 4-O-acyl-β-D-glucuronides ont également été testés seuls ou sous forme de mélanges, ainsi que les diastéréosiomères *R* et *S* des acylglucuronides. La détection des adduits a été réalisée au moyen de techniques directes et indirectes. Les méthodes directes sont l'immunodétection, au moyen d'anticorps dirigés généralement contre le médicament, ou la radiodétection d'adduits marqués. Les méthodes indirectes nécessitent au préalable l'hydrolyse chimique ou enzymatique des protéines adduites et consistent soit à quantifier les adduits par dosage du médicament libéré par chromatographie liquide haute performance (CLHP), soit à analyser les peptides hydrolysés par spectrométrie de masse. D'autres méthodes comme la modification chimique des acides aminés des

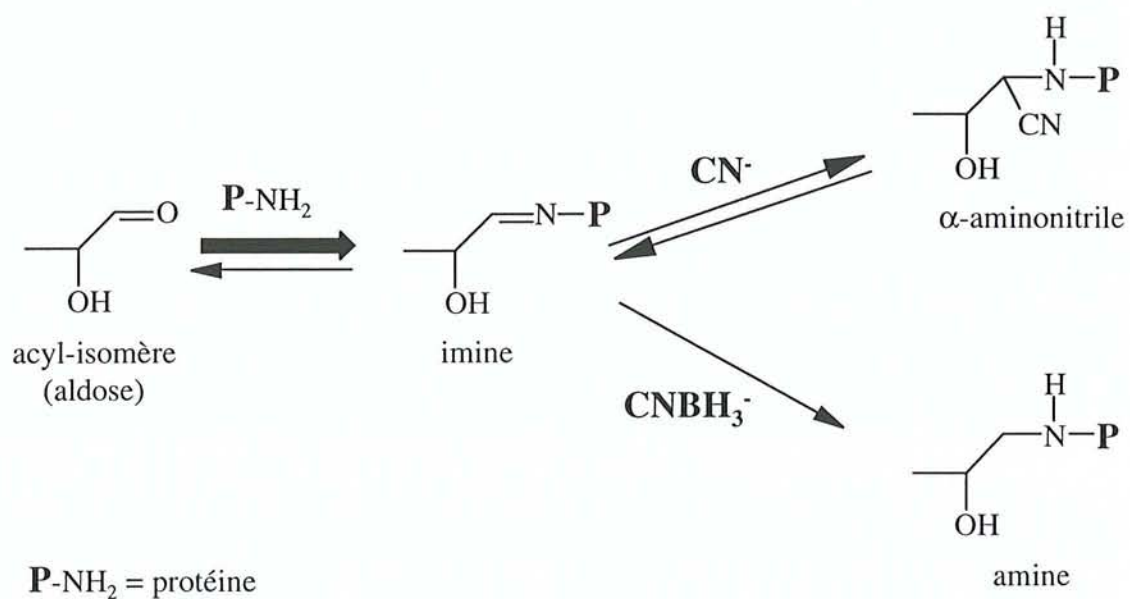


Figure 16. Mécanisme de stabilisation des adduits formés par base de Schiff.
(d'après Smith et al., 1990)

protéines cibles des adduits permettent de donner des renseignements sur les sites de fixation des métabolites réactifs et sur les mécanismes de formation des adduits.

L'albumine sérique est la principale protéine plasmatique cible de la fixation covalente des acylglucuronides. Cependant, Dubois *et al.* (1993) ont montré que d'autres protéines plasmatiques, les α et β -globulines, sont des cibles du glucuronide de kétoprofène.

La formation d'adduits ne se limite pas aux protéines plasmatiques. Les acylglucuronides, apportés directement dans le milieu d'incubation ou synthétisés *in situ* par glucuronoconjugaison si les conditions le permettent, peuvent en effet se fixer de manière covalente sur de nombreuses protéines tissulaires. Les organes cibles sont essentiellement ceux impliqués dans le métabolisme ou l'élimination des médicaments (foie, reins, plasma, intestin), dans lesquels de fortes concentrations de métabolites sont mesurées. Généralement, les adduits sont détectés dès l'apparition de concentrations non négligeables de glucuronides et leur présence persiste dans le plasma même après élimination de l'aglycone et du métabolite. Très souvent, la formation d'adduits a été mise en évidence mais les protéines cibles n'ont pas été formellement identifiées. Le tableau 5 présente quelques exemples de protéines tissulaires cibles de la fixation covalente des acylglucuronides. L'administration chronique de médicaments s'accompagne de taux élevés d'adduits (Zia-Amirhosseini *et al.*, 1995). Un dysfonctionnement rénal induit une accumulation des glucuronides et favorise la formation d'adduits alors qu'une insuffisance hépatique conduit au résultat inverse.

III.2.2.3. Conséquences de la formation d'adduits

La relation entre la formation d'adduits sur les protéines par des métabolites de médicaments et l'apparition de réactions toxiques et/ou immuno-allergiques a été montrée chez l'homme pour certains métabolites hydroxylés produits par les P450. L'acide tiénilique est oxydé par le P450 2C9 en un métabolite très réactif qui se fixe irréversiblement sur l'enzyme à l'origine de sa formation. Ce métabolite est à l'origine d'hépatites chez des patients traités à l'acide tiénilique. De plus, la présence d'auto-anticorps dirigés contre le P450 2C9 (auto-anticorps anti-"liver kidney microsomes" de type 2 (LKM₂)) a été détectée dans le sérum de ces patients, confirmant ainsi l'hypothèse d'une toxicité médiée par le système immunitaire (Lecoeur & Beaune, 1994 ; Dansette *et al.*, 1998 ; Eliasson *et al.*, 1998).

D'autres auto-anticorps ont été détectés dans le sérum de patients atteints d'hépatites virales ou médicamenteuses (tableau 6). Les anticorps anti-LKM₁, dirigés contre le P450 2D6, apparaissent lors d'hépatites auto-immunes de type 2 ou lors d'hépatites C. Les hépatites à la dihydralazine s'accompagnent d'un auto-anticorps anti-"liver microsome", spécifiquement dirigé contre le P450 1A2, enzyme qui transforme la dihydralazine en métabolite réactif qui se fixe de manière covalente sur le P450 1A2. Les anticorps anti-LKM₃ sont dirigés, quant à eux, contre les UGT de la famille 1 (Manns & Obermayer-Straub, 1997).

Tableau 5. Protéines tissulaires cibles de la fixation covalente d'acylglucuronides.

MEDICAMENT	CONDITIONS EXPERIMENTALES	TISSUS CIBLES	PROTEINES DETECTEES	REFERENCES
Diflunisal	tissu hépatique (rat)	foie	110 et 120 kDa	Wang & Dickinson (1998)
	animal (rat)	vessie	?	Dickinson & King (1993)
		reins	?	King & Dickinson (1993)
		intestin et muscles squelettiques	?	
		foie (cytosol, mitochondries, membranes)	28 à 130 kDa	Williams <i>et al.</i> (1995)
	animal (rat)	foie	110, 140 et 200 kDa	Bailey & Dickinson (1996)
Diclofénac	hépatocytes (rat)	foie (RE et membrane plasmique)	50, 60, 80 et 126 kDa	Kretz-Rommel & Boelsterli (1994)
	hépatocytes (rat et homme)	foie	60 kDa	Gil <i>et al.</i> (1995)
	animal (rat)	foie	60 et 80 kDa	Kretz-Rommel & Boelsterli (1994)
		foie		Hargus <i>et al.</i> (1994)
		- RE	50 kDa = <i>CYP2C11</i>	Shen <i>et al.</i> (1997)
		- membrane plasmique	110, 140, 200 kDa 110 kDa et 200 kDa =dipeptidyl dipeptidase IV et dimères	
		intestin	66, 110, 130, 142, 200 kDa 130 kDa = <i>sucrase-isomaltase</i> 142 kDa = <i>aminopeptidase N</i>	Ware <i>et al.</i> (1998)

		cellules de Küpffer	?	Gil <i>et al.</i> (1995)
		cellules endothéliales	?	
	animal (souris)	foie	110 kDa	Wade <i>et al.</i> (1994)
		foie	50, 110, 140 kDa	Pumford <i>et al.</i> (1993)
Sulindac	animal (souris)	foie	110 kDa	Wade <i>et al.</i> (1994)
Tolméline	microsomes	foie, reins, poumons, intestin	?	Ojingwa <i>et al.</i> (1988 et 1994)
Zomépirac	animal (rat)	foie	70, 110, 140, 200 kDa	Bailey & Dickinson (1996)
Bénoxaprofène	microsomes (rat)	foie	43 et 60 kDa	Spahn <i>et al.</i> (1990)
Ibuprofène	animal (souris)	foie	66 kDa	Wade <i>et al.</i> (1994)
Suprofène	microsomes	foie et rein	?	Smith & Liu (1995)
Acide clofibrique	animal (rat)	foie	70 kDa	Bailey & Dickinson (1996)
Acide valproïque	animal (rat)	foie	140 kDa	Bailey & Dickinson (1996)

Tableau 6. Principaux auto-anticorps dirigés contre des P450 et des UGT caractérisés chez des patients atteints d'hépatites (d'après Manns & Obermayer-Straub, 1997).

ANTICORPS	CIBLE ANTIGENIQUE	HEPATITE ASSOCIEE
LKM ₁	P450 2D6 (50 kDa)	<i>hépatite auto-immune de type 2</i> <i>hépatite C</i>
LKM ₂	P450 2C9 (50 kDa)	<i>hépatite à l'acide tiénilique</i> <i>hépatite aux anticonvulsivants</i>
LKM ₃	UGT1 (1A1, 1A4, 1A6) UGT1 et UGT2 (55 kDa)	<i>hépatite auto-immune de type 2</i> <i>hépatite D</i>
LM	P450 1A2 (52 kDa) P450 2E1 (54 kDa) P450 3A de rat (52 kDa)	<i>hépatite à la dihydralazine</i> <i>hépatite à l'halothane</i> <i>hépatite aux anticonvulsivants</i>

La relation entre la formation d'adduits sur les protéines par des acylglucuronides et l'apparition de réactions toxiques et/ou immuno-allergiques n'a cependant pas été explicitement démontrée chez l'homme. La formation d'adduits par les acylglucuronides pourrait avoir deux conséquences (figure 17). L'une, directe, serait provoquée par une modification des fonctions des protéines adduites (toxicité d'organes) et l'autre, indirecte, serait médiée par le système immunitaire (hypothèse des haptènes) (Spahn-Langguth & Benet, 1992). Cependant, l'effet combiné de ces deux mécanismes n'est pas exclu.

III.2.2.3.1. Toxicité induite par modification des protéines

La modification de la structure des protéines, provoquée par la fixation covalente des métabolites réactifs des médicaments, peut provoquer l'altération des fonctions biologiques de ces protéines. La formation d'adduits sur l'albumine plasmatique entraîne des modifications covalentes irréversibles de ses deux sites majeurs de liaison et pourrait ainsi altérer ses fonctions de transporteur de composés endogènes et exogènes (Presle *et al.*, 1996). La fixation covalente du diclofénac au P450 2C11 diminue la déméthylation de la benzphétamine (Shen *et al.*, 1997). De même, la modification de la dipeptidyl peptidase IV par fixation covalente d'un métabolite du diclofénac réduit l'activité de la protéine (Hargus *et al.*, 1995).

III.2.2.3.2. Hypothèse des haptènes

Les complexes covalents que constituent les adduits conduisent à la modification de protéines qui pourraient devenir immunogènes et donner lieu à des réactions d'hypersensibilité (Faed, 1984). C'est la théorie des haptènes. Les médicaments sont généralement de petites molécules (masse molaire inférieure à 1000 Da) qui ne sont pas spontanément immunogènes et qui doivent se lier de manière covalente à des protéines porteuses pour être reconnues par le système immunitaire. L'activation du système immunitaire peut alors induire des réponses spécifiques, à médiation humorale (production d'anticorps spécifiques) ou cellulaire (production de lymphocytes T) (Park & Kitteringham, 1990). Le zomépirac et la tolmétine ont été rapportés comme responsables de réactions anaphylactiques conduisant à la formation d'anticorps de la classe des immunoglobulines E (Samuel, 1981 ; Bretza & Novey, 1985). Ces réactions pourraient être liées à la formation d'adduits à partir de leur acylglucuronide respectif.

La production d'anticorps, utilisés dans les techniques immunochimiques, est d'ailleurs réalisée selon ce principe. L'adduit médicament-protéine, synthétisé chimiquement, est administré à l'animal et provoque une réaction de son système immunitaire conduisant à la production d'anticorps. Les expériences dans lesquelles des animaux ont été immunisés avec des haptènes ont montré que les réponses immunitaires pouvaient être dirigées contre trois types d'épitopes. Certains épitopes peuvent inclure toute ou partie du médicament lié à la protéine porteuse. D'autres peuvent correspondre à de nouvelles structures constituées par la région modifiée de la protéine sur laquelle la drogue est fixée. Enfin, d'autres épitopes correspondent à des régions intactes de la

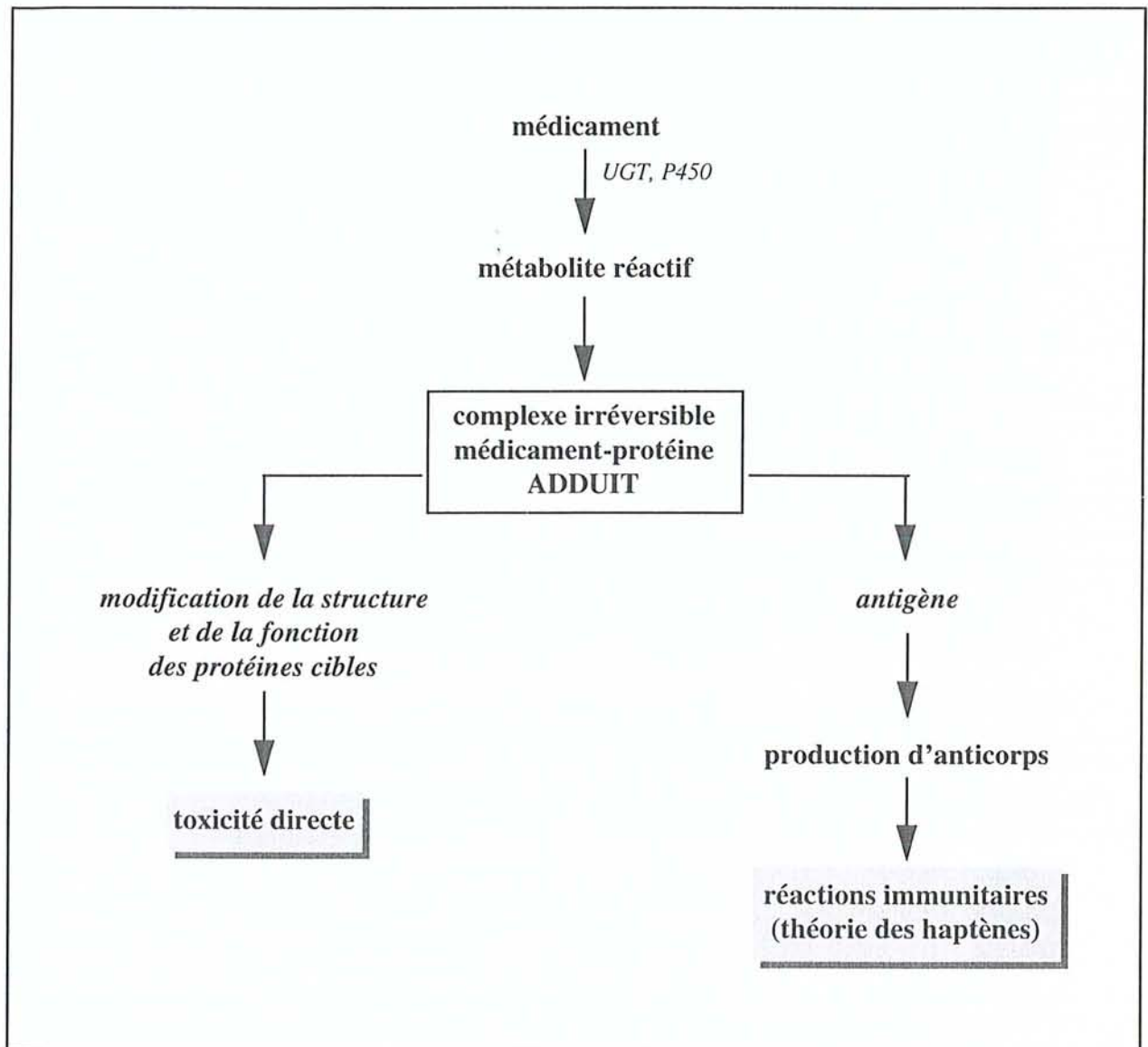


Figure 17. Mécanismes proposés pour expliquer les effets secondaires liés à la formation des adduits.

protéine porteuse, qui ne sont cependant plus tolérées du fait de la liaison avec le médicament (Worrall & Dickinson, 1995).

L'immunogénicité potentielle des adduits dépend de plusieurs facteurs, notamment la nature de la protéine, la densité d'haptènes (nombre de molécules de médicament lié/molécule de protéine), la stabilité des adduits. La demi-vie d'élimination des adduits aux protéines plasmatiques ne semble pas négligeable (environ 10 jours pour les adduits de probénécide, de diflunisal (McKinnon & Dickinson, 1989) et d'acide valproïque (Williams *et al.*, 1992)). De plus, la liaison avec les protéines étant irréversible, l'élimination des adduits semble suivre la demi-vie de la protéine (Reed *et al.*, 1988).

La partie antigénique de l'adduit semble jouer un rôle particulièrement important. Le mécanisme de la base de Schiff pourrait expliquer les réactions allergiques croisées car la partie antigénique aurait en commun l'acide glucuronique. Zia-Amirhosseini *et al.* (1995) ont montré que la formation d'adduits sur l'albumine de souris avec le glucuronide de tolmétine est immunogène chez la souris. Le quart des anticorps ainsi produits réagissent avec le glucuronide de tolmétine et la tolmétine elle-même. Ces anticorps présentent également une sélectivité croisée variable vis-à-vis d'autres glucuronides d'AINS.

III.2.2.3.3. Cas des hépatites aux AINS

En dehors des effets secondaires dus à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines, les AINS présentent parfois des effets indésirables et inattendus, telles que des atteintes hépatiques, rénales et/ou cutanées, dont l'origine reste imprécise (Walker, 1997). La fréquence, la nature et la sévérité de ces réactions, qui varient grandement en fonction de la molécule considérée, ont conduit au retrait du marché de plusieurs AINS (bénoxaprofène, zomépirac,...). La survenue de ces manifestations semble dépendre plus d'une susceptibilité individuelle des patients (idiosyncrasie), que d'une toxicité intrinsèque du médicament, bien que les deux facteurs aient été parfois incriminés et puissent se surajouter l'un à l'autre (Manoukian & Carson, 1996). Le caractère idiosyncrasique de ces réactions est lié au fait que celles-ci ne sont pas reproductibles expérimentalement, qu'elles sont apparemment indépendantes de la dose de médicament administrée, que leur délai d'apparition est variable et souvent long et qu'enfin leur fréquence est faible chez les patients traités.

Les atteintes hépatiques médicamenteuses observées chez de nombreux patients ont fait l'objet de multiples études. L'apparition de ces hépatites est généralement due à la formation de métabolites électrophiles réactifs, générés non seulement par les UGT mais surtout par les P450. Les atteintes hépatiques sont plus ou moins sévères. Dans les cas les plus bénins, elles se traduisent par une élévation transitoire des transaminases, et dans les cas les plus graves, elles peuvent entraîner le décès du patient à la suite d'une nécrose massive du foie. Les lésions correspondantes sont le plus fréquemment hépatocellulaires (diclofénac), mais peuvent être également cholestatiques (bénoxaprofène, diflunisal) ou mixtes (sulindac) (Zimmerman, 1990). Les manifestations cliniques d'atteinte hépatique peuvent être accompagnée de celles d'une réaction d'hypersensibilité (fièvre, éruption, éosinophilie...) (Boelsterli *et al.*, 1995).

Les métabolites issus de voies distinctes (oxydation et glucuroconjugaison) peuvent être individuellement responsables de la formation d'adduits. Ces deux types d'adduits peuvent être impliqués dans la survenue d'atteinte hépatique, par deux mécanismes indépendants (métabolique et immunitaire), dont les effets peuvent se combiner.

La toxicité hépatique induite par le diclofénac illustre la complexité de ces phénomènes. Le diclofénac est un AINS très largement utilisé, associé à de rares cas d'atteintes hépatiques aiguës ou chroniques (Boelsterli *et al.*, 1995). Une corrélation entre la sévérité des symptômes observés et la dose de médicament administrée semble indiquer un certain degré de toxicité directe due à la formation de métabolites réactifs. En particulier, le métabolite généré par oxydation du diclofénac par le P450 2C11, se lie de manière covalente sur l'enzyme dès sa formation (Shen *et al.*, 1997). La formation chez le rat de ces adduits provoque une forte inhibition de l'activité enzymatique catalysée par le P450 2C11. Par ailleurs, la dipeptidyl peptidase IV a été identifiée comme une protéine cible de la fixation covalente du glucuronide de diclofénac chez le rat (Hargus *et al.*, 1995). L'activité enzymatique de cette glycoprotéine membranaire, essentiellement localisée à la surface des parois des canalicules biliaires, est inhibée chez les rats traités au diclofénac. L'hépatotoxicité du diclofénac pourrait être due à l'inhibition directe des enzymes cibles des métabolites réactifs. Outre cette toxicité directe, la présence de ces adduits à la surface de la cellule peut être à l'origine d'une hépatotoxicité à médiation immune (figure 18) (Hargus *et al.*, 1995). En effet, des adduits de diclofénac ont également été retrouvés dans les cellules de Küpffer (Gil *et al.*, 1995), qui jouent un rôle fondamental dans la transformation et la présentation des antigènes aux autres éléments du système immunitaire.

III.2.2.3.4. Réactions anaphylactoïdes

La validation de l'hypothèse des haptènes, qui serait à l'origine de réactions immunologiques par le biais de la fixation covalentes des médicaments ou de leurs métabolites sur les protéines, est complexe dans le cas des AINS. En effet, certains AINS (tolmétine, zomépirac, salicylés) sont par ailleurs à l'origine de réactions anaphylactoïdes. L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS a pour conséquence d'augmenter la quantité d'acide arachidonique disponible pour la voie de la lipoxigénase, et ainsi de favoriser indirectement la synthèse des substances anaphylactoïdes responsables de réactions pseudo-allergiques (Spahn-Langguth & Benet, 1992).

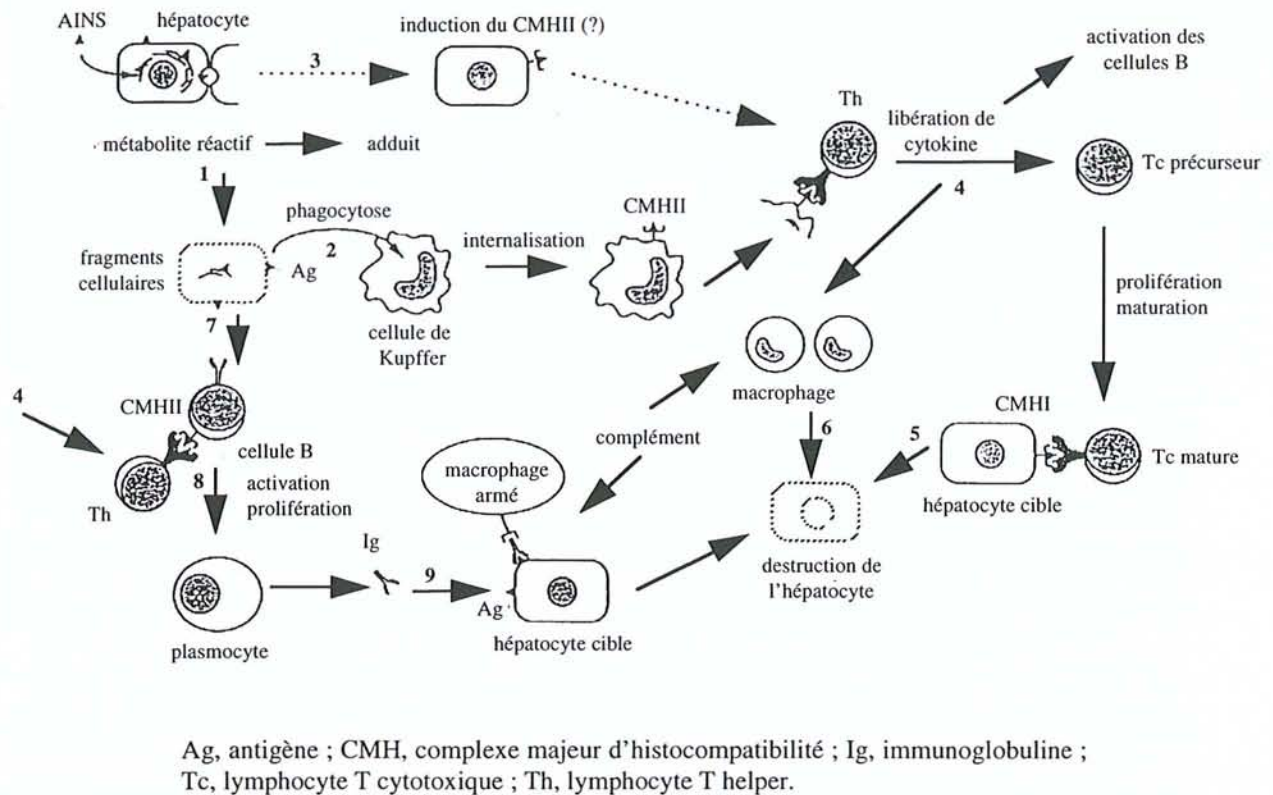


Figure 18. Mécanismes hypothétiques de l'hépatotoxicité à médiation immunitaire induite par la formation d'adduits (d'après Boelsterli et al., 1995).

- (1) Les adduits covalents AINS- ou métabolites-protéines intracellulaires deviennent accessibles aux cellules du système immunitaire après la dégradation de l'hépatocyte ou parce qu'ils sont intégrés à la membrane plasmique.
- (2) Les adduits sont phagocytés par les cellules de présentation des antigènes (cellules de Küpffer et autres macrophages), qui les transforment (protéolyse partielle) et les présentent à leur surface en combinaison avec les antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'haptène ou des épitopes de conformation des peptides antigéniques sont alors reconnus par les récepteurs des cellules T helper (Th).
- (3) Il y a possibilité d'une induction *de novo* du CMH II à la surface des hépatocytes.
- (4) Les lymphocytes Th activés libèrent des cytokines, qui stimulent l'activation des cellules B (8) et provoquent la multiplication et la maturation des cellules T cytotoxiques (Tc) à partir de cellules précurseurs.
- (5) Les cellules Tc reconnaissent les antigènes présentés en combinaison avec le CMH I à la surface des hépatocytes et détruisent les cellules cibles.
- (6) Les cellules Th activés libèrent également des lymphokines, qui permettent l'activation des macrophages et la destruction des cellules cibles, par différents médiateurs (interleukine-1).
- (7) Les adduits peuvent aussi réagir avec des récepteurs de cellules B, qui vont les phagocyter, les transformer et les présenter en association avec le CMH II.
- (8) Les cellules Th provoquent l'activation des cellules B, c'est-à-dire leur multiplication, leur maturation et leur différenciation en plasmocytes qui vont alors sécréter des anticorps spécifiques (Ig).
- (9) Ces anticorps spécifiques reconnaissent et se fixent sur les épitopes présents à la surface des hépatocytes (adduits). La formation de ce complexe immunitaire conduit à la destruction de l'hépatocyte, à la suite d'une reconnaissance non spécifique par un récepteur Fc d'une cellule tueuse ou d'un macrophage, ou d'une activation du complément.

Chapitre 2. Présentation de l'étude et objectifs du travail

Chapitre 2. Présentation de l'étude et objectifs du travail

Notre étude a principalement été consacrée à l'investigation de la réactivité des métabolites des acides carboxyliques ainsi qu'à ses implications pharmaco/toxicologiques. De manière complémentaire, nous avons également étudié la structure et la fonction des UGT impliquées dans la formation d'acylglucuronides.

⇒ Investigation de la réactivité des métabolites des acides carboxyliques

♦ Réactivité de métabolites d'acides carboxyliques exogènes

➤ *Acylglucuronide de kétoprofène*

L'utilisation des AINS dans le traitement symptomatique des pathologies inflammatoires chez l'homme est très répandue. La glucuronoconjugaison est la voie métabolique principale de ces médicaments à structure carboxylique. Cette réaction conduit à la formation d'acylglucuronides réactifs capables de se lier de manière covalente aux protéines pour former des adduits. Les cibles plasmatiques des acylglucuronides d'AINS ont été largement étudiées dans la littérature. En revanche, un nombre plus limité de travaux est consacré aux cibles intracellulaires (Spahn-Langguth & Benet, 1992).

Le kétoprofène est un AINS dérivé de l'acide 2-phénylpropionique (profène) largement prescrit en thérapeutique. Dans notre laboratoire, la réactivité de l'acylglucuronide de kétoprofène vis-à-vis de l'albumine humaine a été démontrée, et les mécanismes impliqués ont été élucidés (Dubois *et al.*, 1993 ; Presle *et al.*, 1996). Notre étude se porte sur les cibles intracellulaires potentielles de ce métabolite.

Nous émettons l'hypothèse selon laquelle l'acylglucuronide de kétoprofène, généré par glucuronoconjugaison, pourrait réagir avec les protéines à l'origine même de sa formation, en l'occurrence les UGT. Notre objectif est de déterminer si les UGT constituent des cibles protéiques du glucuronide de kétoprofène et d'établir les conséquences éventuelles de la formation des adduits sur la fonctionnalité de ces protéines. Les résultats de ces travaux sont présentés et discutés dans la publication :

Human and rat liver UDP-glucuronosyltransferases are targets of ketoprofen acylglucuronide

Nadège Terrier, Etienne Benoît, Claire Senay, Françoise Lapicque, Anna Radomska-Pandya, Jacques Magdalou and Sylvie Fournel-Gigleux

Molecular Pharmacology **56**: 226-234 (1999)

L'étude de la réactivité des acylglucuronides nécessite de disposer de quantités importantes du glucuronide d'intérêt, en l'occurrence le glucuronide de kétoprofène. Nous avons d'abord synthétisé le glucuronide de kétoprofène selon une méthode enzymatique précédemment développée au laboratoire avec succès pour produire divers glucuronides de médicaments. Cette méthode consiste à produire le glucuronide au moyen d'un bioréacteur constitué par des UGT microsomaux immobilisés dans des billes d'alginate, et permet d'obtenir quelques milligrammes de glucuronide. Cependant, afin de produire des quantités supérieures d'acylglucuronide, nous avons mis en œuvre une synthèse chimique dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Yves Chapleur et le Dr. Françoise Chrétien (Laboratoire de Méthodologie et Synthèse Enantiospécifique de Biomolécules, UMR 7565 CNRS-Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté des Sciences, Vandœuvre-lès-Nancy).

➤ *Kétoprofényle CoA*

La majorité des profènes présente la particularité d'être sujet à une inversion chirale de l'énantiomère *R* vers l'énantiomère *S*. Cette inversion fait intervenir la formation d'un thioester de CoA de l'énantiomère *R* de l'AINS (acyl CoA). Cet intermédiaire réactif est susceptible de se lier de manière covalente aux protéines pour former des adduits. Il peut également entrer en compétition avec des acyl CoA d'acides gras et s'incorporer par acylation sur le glycérol de lipides constitutifs de la membrane (glycérides et phospholipides). La formation de lipides hybrides modifie les propriétés physicochimiques des membranes et la pharmacocinétique des profènes (augmentation de la durée de vie des médicaments).

L'inversion chirale et l'incorporation dans les tissus adipeux du kétoprofène ont été observées *in vivo* chez le rat. Ce résultat implique la biosynthèse du kétoprofényle CoA. Nous posons deux hypothèses. La première est que le kétoprofényle CoA, généré par inversion chirale du kétoprofène, pourrait réagir avec les protéines intracellulaires de son environnement, en particulier les UGT. La deuxième est que le kétoprofényle CoA pourrait également, en s'incorporant dans les lipides de la membrane du RE, être à l'origine d'une perturbation de l'organisation de la membrane et ainsi provoquer une inactivation des protéines membranaires phospholipidodépendantes, en l'occurrence les UGT. Nos objectifs sont d'analyser la réactivité du kétoprofényle CoA sur les UGT et d'établir les conséquences de la formation d'adduits ou de triglycérides hybrides sur l'activité catalytique de ces enzymes. Nous comparerons en outre la réactivité du kétoprofényle CoA avec la réactivité du glucuronide de kétoprofène dans le but de déterminer l'importance relative des conséquences toxicologiques engendrées par deux métabolites issus d'un même médicament.

◆ Réactivité de métabolites d'acides carboxyliques endogènes

➤ *Acylglucuronides d'acide rétinoïque tout-trans et d'acide lithocholique*

La glucuronoconjugaison est également impliquée de façon importante dans le métabolisme d'acides carboxyliques endogènes tels que l'acide rétinoïque tout-*trans* et les acides biliaires (acide lithocholique). Les acylglucuronides formés, tout comme les acylglucuronides produits à partir d'acides carboxyliques exogènes, sont susceptibles de former des adduits avec les UGT à l'origine de leur biosynthèse et de moduler l'activité biologique de ces enzymes. Ainsi, les acylglucuronides

d'acides carboxyliques endogènes pourraient, par ce biais, être à l'origine d'une variation de la glucuronoconjugaison *in vivo*. Notre objectif est d'analyser une éventuelle réactivité des glucuronides d'acide rétinoïque tout-trans et d'acide lithocholique avec les UGT. Nous tenterons également d'établir les bases moléculaires de la différence de réactivité observée entre les divers acylglucuronides testés.

L'acide rétinoïque tout-*trans* et ses dérivés constituent de puissants principes actifs dans le traitement des cancers chez l'homme (Tallman & Wiernik, 1992). Leur mode d'action comme modulateurs de l'expression génique fait intervenir plusieurs familles de récepteurs nucléaires (RAR, RXR) (Lohnes *et al.*, 1992). Cependant, l'administration des rétinoïdes provoque des réactions indésirables variées (photosensibilisation, irritation des muqueuses, états dépressifs) et des effets toxiques (téatogénicité, atteintes hépatiques) qui limitent leur utilisation. La glucuronoconjugaison constitue une voie métabolique majeure de l'acide rétinoïque tout-*trans*. Le glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* pourrait être actif et posséder des propriétés thérapeutiquement intéressantes comme l'absence de téatogénicité (Creech Kraft *et al.*, 1991). Les "cellular retinoic acid binding proteins" (CRABP), quant à elles, sont les protéines cytosoliques impliquées dans le transport de l'acide rétinoïque tout-*trans* et de ses dérivés jusqu'aux récepteurs nucléaires avec lesquels ils interagissent.

Notre hypothèse est que l'interaction du glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* avec les récepteurs nucléaires des rétinoïdes nécessite au préalable le transport du glucuronide jusqu'à ces récepteurs, notamment par les CRABP. Notre objectif est de déterminer si le glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* constitue ou non un ligand des CRABP. Pour ce faire, nous utiliserons l'acide rétinoïque radiomarké comme sonde photo-activable, outil qui procure en outre l'avantage d'identifier d'autres ligands potentiels des CRABP. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Anna Radomska-Pandya (University of Arkansas for Medical Sciences, Gastroenterology Division, Little Rock, AR).

L'ensemble des résultats de ces travaux sont présentés dans l'article :

Retinoyl- β -D-glucuronide and 5,6-epoxy-retinoic acid are novel ligands for cellular retinoic acid binding proteins I and II as identified by photoaffinity labeling with [3 H] all-*trans* retinoic acid

Anna Radomska-Pandya, Guangping Chen, Victor M. Samokyszyn, Joanna M. Little, Walter E. Gall, Gregory Zawada, **Nadège Terrier**, Jacques Magdalou, Piotr Czernik
Manuscrit soumis

➤ Acyl CoA d'acides gras

Les acyl CoA d'acides gras sont des intermédiaires réactifs du métabolisme des acides gras qui permettent leur incorporation aux lipides. Cette réactivité est également observée vis-à-vis des protéines (acylation de résidus sérine ou cystéine) et pourrait contribuer à la régulation de leur fonction biologique (Yamashita *et al.*, 1995).

L'inhibition des UGT par les acyl CoA a déjà été rapportée dans la littérature (Krcmery & Zakim, 1993). Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas complètement élucidés et sont controversés. Certains auteurs expliquent cette inactivation par une acylation de la protéine (Yamashita *et al.*, 1995). D'autres montrent l'implication de mécanismes indirects : les acyl CoA inhiberaient la glucuronoconjugaison dépendante des cations divalents, par complexation des ions et diminution de la concentration intracellulaire de calcium (Csala *et al.*, 1996).

De plus, comme il a été montré au laboratoire, les acides gras sont des acides carboxyliques qui peuvent être substrats des UGT (Pritchard *et al.*, 1994), et sont éliminés par glucuronoconjugaison lorsque les voies classiques de métabolisation par oxydation sont défaillantes (Duran *et al.*, 1985 ; Kuhara *et al.*, 1986). Ainsi, les acides gras et les acyl CoA peuvent occuper les sites de fixation des substrats des isoformes d'UGT impliquées dans leur métabolisme.

Notre objectif est d'élucider les mécanismes et les conséquences potentielles de la réactivité des acyl CoA d'acides gras sur les UGT, et de comparer la réactivité de ces acyl CoA d'acides gras à celle d'autres métabolites acyl CoA, notamment le kétoprofényl CoA.

♦ Relation entre la formation d'adduits et la survenue d'incidents immuno-allergiques

L'administration d'AINS s'accompagne d'effets indésirables liés à leurs actions pharmacologiques et à leurs voies métaboliques. Comme nous l'avons souligné, les acylglucuronides issus du métabolisme de ces médicaments sont capables de se fixer de manière covalente sur les protéines plasmatiques et tissulaires. Les protéines modifiées par la formation d'adduits pourraient jouer le rôle d'haptènes et être à l'origine des effets secondaires immuno-allergiques et hépatotoxiques qui surviennent parfois lors de l'administration de ces médicaments.

A l'appui de cette hypothèse, certains auteurs ont montré que les UGT, de manière analogue aux P450, peuvent constituer des néo-antigènes à l'origine de la formation d'auto-anticorps lors d'hépatites virales ou médicamenteuses (Manns & Obermayer-Straub, 1997).

Ayant démontré que les UGT sont des cibles intracellulaires d'acylglucuronides, nous envisageons la possibilité que ces adduits peuvent être à l'origine de la formation d'auto-anticorps dirigés contre les UGT. Nous avons démarré un travail dont l'objectif est de rechercher l'existence d'auto-anticorps dirigés contre les UGT chez des patients atteints d'hépatites virales. Ce travail est réalisé dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Etienne Benoît (Laboratoire de Toxicologie et Métabolisme Comparés des Xénobiotiques, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile) et l'équipe du Pr. Jean-Charles Monier (Laboratoire d'Immunologie-Pathologie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite).

⇒ Etude de la structure et de la fonction des UGT impliquées dans la formation d'acylglucuronides

♦ Clonage et expression stable de l'UGT2B7 dans les cellules V79

En raison du caractère réactif des acylglucuronides et des conséquences pharmacotoxicologiques et physiopathologiques de la formation des adduits, il est nécessaire

d'identifier et de caractériser les isoformes d'UGT impliquées dans la biotransformation des acides carboxyliques à l'origine de la formation de ces métabolites. L'UGT2B1 a été précédemment identifiée dans notre laboratoire comme l'isoforme principalement responsable du métabolisme des acides carboxyliques chez le rat (Pritchard *et al.*, 1994). Plus récemment, le clonage et l'expression de l'isoforme UGT2B7 humaine a suggéré l'implication de cette enzyme dans la conjugaison des acides carboxyliques (Jin *et al.*, 1993).

Dans le but d'étudier la contribution de cette isoforme dans la formation des acylglucuronides et d'élucider les éléments structuraux qui conditionnent la prise en charge des acides carboxyliques, nous l'avons exprimée de manière stable dans les cellules V79 et nous avons testé sa spécificité de substrats.

♦ Développement de stratégies d'étude de l'organisation du site actif des UGT : cas de l'UGT1A6 humaine

Ce volet de l'étude montre notre implication dans des travaux qui portent sur le développement de stratégies de génie génétique et protéique telles que l'utilisation de marqueurs d'affinité, la modification chimique, la mutagenèse dirigée, combinées à la modélisation moléculaire et la comparaison de séquences primaires des protéines. Ces stratégies sont destinées à caractériser d'un point de vue moléculaire le site actif des UGT permettant ainsi de mieux comprendre le fonctionnement de ces enzymes. L'isoforme UGT1A6 humaine, très étudiée au laboratoire, est également impliquée dans le métabolisme de certains AINS (*S*-naproxène, Ebner & Burchell, 1993) et constitue notre UGT modèle. Les résultats de ces études sont présentés dans les publications:

Interaction of periodate-oxidized UDP-glucuronic acid with recombinant human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6

Eric Battaglia, Nadège Terrier, Magdalena Mizeracka, Claire Senay, Jacques Magdalou, Sylvie Fournel-Gigleux and Anna Radomska-Pandya

Drug Metabolism and Disposition **26** (8): 812-817 (1998)

Role of the highly conserved cysteine 126 in the activity of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6

Claire Senay, Gabrielle Jedlitschky, Nadège Terrier, Brian Burchell, Jacques Magdalou and Sylvie Fournel-Gigleux

Manuscrit soumis

♦ Application des stratégies développées à l'étude de l'organisation du site actif de l'UGT2B7 humaine

L'expression hétérologue de l'UGT2B7, couplée à l'utilisation d'agents de modification chimique et de sondes photo-activables sont des outils qui permettent d'explorer l'organisation du site actif de cette enzyme impliquée dans le métabolisme des acides carboxyliques.

Ce travail é été réalisé dans le cadre de la collaboration avec le Pr. Anna Radomska-Pandya (University of Arkansas for Medical Sciences, Gastroenterology Division, Little Rock, AR). Les résultats préliminaires sont présentés dans la publication :

A functional role for acidic amino acids of the human liver recombinant UDP-glucuronosyltransferase 2B7 in catalysis

Nadège Terrier, Piotr Czernik, Guangping Chen, Sylvie Fournel-Gigleux, Jacques Magdalou and Anna Radomska-Pandya

Manuscrit en préparation

Chapitre 3. Matériel et méthodes

Chapitre 3. Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Réactifs biochimiques

Le *RS*-kétoprofène [acide *R,S* 2-(3-phenylbenzoyl) propionique], le 1-naphtol, le 2-naphtol, la 4MO, l'androstérone, l'acide rétinolique tout-*trans*, l'acide rétinolique 9-*cis*, l'acide rétinolique 13-*cis*, le rétinol, le rétinol 13-*cis*, l'acide lithocholique, l'acide octanoïque, l'acide palmitique, le CoA, l'octanoyl CoA, le palmitoyl CoA, l'oléoyl CoA et l'acide 1,4-lactone D-saccharique (saccharonolactone) sont fournis par Sigma (L'Isle d'Abeau, St. Quentin Fallavier, France). L'UDPGA (sel de sodium) provient de chez Boehringer (Mannheim, Allemagne). Les substrats radiomarqués [^{14}C]UDPGA (80 mCi/mmol), [^3H]androstérone (5,8 mCi/mmol) et [^3H]acide rétinolique marqué sur les hydrogènes 10 et 11 (8,0 mCi/mmol) sont fournis par NEN Life Science Products (Boston, MA).

Les agents de modification chimique tels que le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCI), le *N*-éthyl-*N'*-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), le WK sont fournis par Sigma. Le *N*-éthylmaléimide, le *N*-phénylmaléimide et l'acide iodoacétique proviennent d'Aldrich (L'Isle d'Abeau, Saint-Quentin Fallavier, France). L'acide 2-(5,5'-dithiobis)nitrobenzoïque et le *S*-méthyl méthaneethiosulfonate sont fournis par Fluka (Buchs, Suisse).

1.2. Réactifs de biologie cellulaire et moléculaire

Le milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, 4,5 mg/mL de glucose) et les antibiotiques (streptomycine, pénicilline, généticine (G418)) sont fournis par Gibco-BRL (Eragny, France). Le Nu-serum[®] provient de chez TEBU (Le Perray-en-Yvelines, France). L'acide *n*-butyrique (sel de sodium) est fourni par Sigma.

Les vecteurs pCDNA1.1 et pCR2.1 et les bactéries compétentes MC1061/P3 sont fournis par Invitrogen (Leek, Pays-Bas). Les enzymes de restriction et la *Vent* DNA polymerase[®] proviennent de chez NE BioLabs (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). L'agent de transfection Exgen[®] est fourni par Euromedex (Souffelweyersheim, France).

1.3. Réactifs chimiques

Les réactifs chimiques tels que le 2,3,4,6-tétra-*O*-benzyl-D-glucose et le 2,2,6,6-tétraméthyl-1-piperidinyloxy (radical libre, TEMPO) sont fournis par Aldrich. Tous les solvants utilisés pour la synthèse chimique sont purifiés par distillation sur des réactifs appropriés : P_2O_5 pour le dichlorométhane, magnésium pour le méthanol et carbonate de calcium pour l'acétate d'éthyle. La pyridine sèche, de qualité pour analyse, provient de Sigma.

Le kétoprofényle CoA a été synthétisé dans notre laboratoire par Nicolas Levoin, à partir de RS-kétoprofène et de CoA, d'après la méthode chimique proposée par Goldman et Vagelos (1961). L'acide 5,6-époxy-rétinoïque et l'acide 4-hydroxy-rétinoïque ont été synthétisés selon la méthode décrite par Samokyszyn *et al.* (1999).

L'acide 7,7,7-triphénylheptanoïque, inhibiteur des UGT, a été synthétisé selon la méthode décrite par Fournel-Gigleux *et al.* (1989a).

Les composés chimiques synthétisés présentent un spectre de masse ou de RMN ^1H compatible à la structure attendue.

II. Préparation des fractions protéiques

II.1. Microsomes hépatiques

II.1.1. Microsomes hépatiques humains

Les microsomes hépatiques humains sont préparés à partir de foies sains de transplantation par ultracentrifugations différentielles selon la méthode de Dragacci *et al.* (1987).

II.1.2. Microsomes hépatiques de rat

Des rats mâles Wistar (180-200 g, Iffa-Crédo, Saint-Germain l'Abresle, France) sont traités au phénobarbital (sel de sodium, Fluka), un inducteur des UGT de la famille 2B (Mackenzie *et al.*, 1989). Une dose unique de 100 mg/kg d'une solution de phénobarbital dans du NaCl (0,9% v/v) est injectée aux rats par voie intra-péritonéale. Les rats reçoivent ensuite, pendant 4 jours, une solution de phénobarbital à 1 g/L comme eau de boisson. Ils sont sacrifiés le 5^{ème} jour. Les microsomes hépatiques sont préparés à partir des foies par ultracentrifugations différentielles selon la méthode de Hogeboom (1955).

II.2. UGT recombinantes

II.2.1. Etablissement des lignées stables dans les cellules V79 et HK293

L'expression hétérologue dans les cellules de mammifères en culture repose sur l'utilisation de vecteurs permettant la transcription efficace de l'ADNc à exprimer, sous le contrôle d'un promoteur viral fort (cytomegalovirus), dans la cellule hôte sélectionnée.

II.2.1.1. Lignées V79-UGT1A6, V79-UGT2B1 et HK293-UGT2B7

Les lignées cellulaires V79 (fibroblastes de poumon de hamster chinois) transfectées de manière stable par l'isoforme humaine UGT1A6 et l'isoforme de rat UGT2B1 ont été établies dans notre laboratoire respectivement par Fournel-Gigleux *et al.* (1991) et Pritchard *et al.* (1994). L'établissement de la lignée cellulaire HK293 (cellules embryonnaires de rein humain) transfectée de manière stable par l'isoforme humaine UGT2B7 a été décrit par Coffman *et al.* (1998).

II.2.1.2. Lignée V79-UGT2B7

Le clonage de l'UGT2B7 a été réalisé au laboratoire en collaboration avec le Dr. Mohamed Ouzzine par amplification par "polymerase chain reaction" de la séquence d'intérêt, à partir d'une banque de foie humain (Clontech, Palo Alto, CA), au moyen des amorces appropriées (Ritter *et al.*, 1990). L'ADNc obtenu a été sous-cloné dans le site *EcoRV* du vecteur pCDNA1.1, séquencé et utilisé pour l'établissement d'une lignée stable dans les cellules V79. A cette fin, nous avons cotransfecté le plasmide recombinant dans les cellules V79 avec le plasmide SFVneo au moyen d'un lipide cationique (Exgen®). Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont repiquées à la dilution 1/5 et placées vingt-quatre heures plus tard dans un milieu de sélection contenant de la généticine (G418, 1 mg/mL). Les colonies résistantes sont ensuite isolées, amplifiées et testées en terme d'activité catalytique en utilisant l'androstérone comme substrat modèle pour sélectionner les plus actives.

II.2.2. Conditions de culture des lignées cellulaires

Les cellules V79 et HK293 sont cultivées en monocouche en milieu DMEM complet supplémenté par 8% (v/v, cellules non transfectées et cellules V79-UGT1A6, V79-UGT2B7 et HK293-UGT2B7) ou 5% (v/v, cellules V79-UGT2B1) de Nu-serum® et par des antibiotiques (0,1 mg/mL de streptomycine et 100 unités/mL de pénicilline). Les concentrations en Nu-serum® ont été mises au point pour une expression maximale et stable des protéines. L'expression des UGT recombinantes est augmentée par traitement des cellules pendant 24 heures avec 2 mM d'acide *n*-butyrique (sel de sodium) avant récolte.

II.2.3. Préparation des fractions membranaires

Les fractions membranaires sont préparées à partir d'homogénats cellulaires, par ultracentrifugations différentielles selon une technique adaptée de Battaglia *et al.* (1994). En résumé, les culots cellulaires sont mis en suspension dans un tampon 5 mM acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (Hepes) (pH 7,4), 0,25 M saccharose, soumis à une sonication trois fois 5 à 10 secondes, puis centrifugés à 10000 *g* pendant 10 minutes. Les fractions membranaires sont finalement obtenues par ultracentrifugation du surnageant à 100000 *g* pendant 1 heure et sont conservées à -80°C.

II.3. CRABP

Les CRABP I et II ont été exprimées et purifiées CLHP selon la méthode utilisée par Jamison *et al.* (1994). La concentration protéique des CRABP I et II est respectivement de 1,33 et 1,20 mg/mL.

II.4. Dosage protéique

La concentration protéique des fractions est mesurée selon la méthode de Lowry *et al.* (1951), ou selon la méthode de Bradford (1976), en utilisant l'albumine sérique bovine (fraction V, Sigma) comme standard.

III. Méthodes de dosage de la glucuronoconjugaison

Les techniques utilisées pour analyser les glucuronides formés après glucuronoconjugaison, en vue de leur quantification, sont la CLHP, l'extraction liquide/liquide et la chromatographie sur couche mince (CCM), couplées à des méthodes de détection qui sont la spectrophotométrie, la fluorescence et la radiodétection.

L'activité catalytique de différentes sources d'UGT a été évaluée : microsomes hépatiques humains et fractions membranaires de cellules recombinantes V79 ou HK293 transfectées de manière stable par les isoformes 1A6 (homme), 2B1 (rat) ou 2B7 (homme). Les conditions optimales de dosage d'activité enzymatique (linéarité de la réaction en fonction du temps et de la concentration en protéines, concentrations saturantes en UDPGA et en aglycone) pour chaque type d'UGT et pour chaque substrat utilisé ont été déterminées précédemment.

Les substrats et les techniques analytiques de dosage, utilisés pour mesurer la glucuronoconjugaison catalysée par ces enzymes, sont présentés dans le tableau 7.

III.1. Dosage des glucuronoconjugués par CLHP en phase inverse couplée à la spectrophotométrie

La quantification des glucuronides de 1-naphtol, de 2-naphtol et de kétoprofène a été réalisée par CLHP en phase inverse couplée à la spectrophotométrie.

III.1.1. 1- et 2-Naphtol

La réaction enzymatique consiste à incuber à 37°C, pendant 15 à 20 minutes, les protéines (20 à 50 µg), dans 100 µl de tampon 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂ avec le substrat de la réaction (1 mM final de 1- ou 2-naphtol, solubilisé dans le diméthylsulfoxyde, volume inférieur à 5% du volume final) et l'UDPGA (2 mM final, solubilisé dans l'eau). La réaction est arrêtée à 4°C par addition de 10 µl d'HCl 6 N et les protéines sont précipitées par centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes.

Les surnageants sont analysés par séparation sur une colonne Lichrospher RP18, 5 µm, 125 x 4 mm (Merck, Darmstadt, Allemagne). Les conditions chromatographiques sont les suivantes : la phase mobile est composée d'un mélange acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique (35:65:0,04, v/v), le débit de la phase mobile est de 0,5 mL/min et la détection est réalisée à 229 nm. Les quantités de glucuronides de 1- ou 2-naphtol injectés sur la colonne sont évaluées par comparaison avec une

Tableau 7. Choix des substrats et des techniques analytiques de dosage pour évaluer la glucuronoconjugaison catalysée par différentes sources d'UGT.

Enzyme	Substrat	Technique analytique	
		Séparation	Détection
Microsomes hépatiques	<i>1-naphtol</i>	CLHP	spectrophotométrie (229 nm) ¹
		extraction l/l	fluorescence (ex/em 290/330 nm) ²
	<i>4MO</i>	extraction l/l	fluorescence (ex/em 320/380 nm) ³
	<i>kétoprofène</i>	CLHP	spectrophotométrie (256 nm) ¹
	<i>androstérone</i>	CCM	radiodétection ^{5, 6}
UGT1A6 (homme)	<i>1-naphtol</i>	CLHP	spectrophotométrie (229 nm) ¹
		extraction l/l	fluorescence (ex/em 290/330 nm) ²
	<i>4MO</i>	extraction l/l	fluorescence (ex/em 320/380 nm) ³
	<i>2-naphtol</i>	CLHP	spectrophotométrie (229 nm) ¹
	<i>kétoprofène</i>	CLHP	spectrophotométrie (256 nm) ⁴
UGT2B7 (homme)	<i>kétoprofène</i>	CLHP	spectrophotométrie (256 nm) ⁴
	<i>androstérone</i>	CCM	radiodétection ^{5, 6}
	<i>acide rétinoïque</i>	CCM	radiodétection ^{5, 6}

l/l, liquide/liquide

¹ Méthode mise au point au laboratoire² Méthode adaptée de Bock & White (1974)³ Lilienblum *et al.* (1982)⁴ Chakir *et al.* (1994)⁵ Radomska-Pyrek *et al.* (1987)⁶ Bansal & Gessner (1980)

gamme étalon réalisée au moyen de quantités croissantes en 1- β -D-glucuronide de 1-naphtol (1 à 25 nmoles, Sigma). Les activités spécifiques sont exprimées en nmol. min⁻¹.mg⁻¹ de protéines.

III.1.2. Kétoprofène

La réaction enzymatique consiste à incuber à 37°C, pendant 15 à 20 minutes, les protéines (50 à 100 μ g), dans 100 μ l de tampon 100 mM acétate de sodium (pH 5,4), 10 mM MgCl₂, avec le kétoprofène (1 mM final, solubilisé dans le diméthylsulfoxyde, volume inférieur à 5% du volume final) et l'UDPGA (2 mM final, solubilisé dans l'eau), en présence de saccharonolactone (4 mM final, solubilisé dans le tampon d'activité enzymatique), un inhibiteur des β -glucuronidases actives à pH acide. La réaction est arrêtée à 4°C par addition de 200 μ l de tampon 0,4 M acide trichloracétique, 0,6 M glycine (pH 2,2) et les protéines sont précipitées par centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes.

Les surnageants sont analysés par séparation sur une colonne Lichrospher RP18, 5 μ m, 125 x 4 mm (Merck). Les conditions chromatographiques sont les suivantes : la phase mobile est composée d'un mélange acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique (35:65:0,04, v/v), le débit de la phase mobile est de 0,8 mL/min et la détection est réalisée à 256 nm. Les quantités de glucuronide de kétoprofène injecté sur la colonne sont directement évaluées par comparaison avec une gamme étalon réalisée au moyen de quantités croissantes en kétoprofène (0,01 à 5 nmoles). En effet, nous avons vérifié que l'addition du résidu glucuronique, qui n'absorbe pas dans l'UV, ne modifie pas le spectre UV du kétoprofène (coefficient d'extinction molaire et λ_{max} inchangés). Le kétoprofène et les glucuronides de kétoprofène ont donc le même spectre UV mais des temps de rétention différents dus à des propriétés d'hydrophobicité différentes. Les activités spécifiques sont exprimées en nmol. min⁻¹.mg⁻¹ de protéines.

III.2. Dosage des glucuronosconjugués par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence

La quantification des glucuronides de 1-naphtol et de 4MO a été réalisée par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence, selon les protocoles adaptés de Bock & White (1974) et Lilienblum *et al.* (1982), respectivement.

III.2.1. 1-Naphtol

La réaction enzymatique consiste à incuber à 37°C, pendant 15 minutes, les protéines (5 à 100 μ g), dans 200 μ l de tampon Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, avec le 1-naphtol (1 mM final, solubilisé dans le diméthylsulfoxyde, volume inférieur à 5% du volume final) et l'UDPGA (2 mM final, solubilisé dans l'eau). La réaction est arrêtée à 4°C par addition de 200 μ l de tampon 0,4 M acide trichloracétique, 0,6 M glycine (pH 2,2). Le 1-naphtol non conjugué est extrait par 4 mL de chloroforme et centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes. La lecture au fluorimètre (Hitachi F-2000 Fluorescence Spectrophotometer, Science Tech, Tokyo, Japon), aux longueurs d'onde d'excitation et

l'émission de 290 nm et 330 nm, respectivement, se fait immédiatement après addition de 1,9 mL de NaOH 0,1 M à 100 µl de la phase aqueuse.

Les quantités de glucuronide de 1-naphtol présentes dans le milieu réactionnel sont évaluées par comparaison avec l'intensité de fluorescence d'une gamme étalon réalisée au moyen de quantités croissantes de 1-β-D-glucuronide de 1-naphtol (1 à 25 nmoles, Sigma). Les activités spécifiques sont exprimées en nmol. min⁻¹.mg⁻¹ de protéines.

III.2.2. 4MO

La réaction enzymatique consiste à incuber à 37°C, pendant 15 à 20 minutes, les protéines (5 à 20 µg), dans 200 µl de tampon Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, avec la 4MO (1 mM final, solubilisé dans le diméthylsulfoxyde, volume inférieur à 5% du volume final) et l'UDPGA (2 mM final, solubilisé dans l'eau). La réaction est arrêtée à 4°C par addition de 800 µl d'eau glacée. La 4MO non conjuguée est extraite par 3,5 mL d'acétate d'éthyle saturé en eau et centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes. La lecture au fluorimètre (Hitachi F-2000 Fluorescence Spectrophotometer), aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 320 nm et 380 nm, respectivement, se fait immédiatement après addition de 1,8 mL de 0,25 M glycine-NaOH (pH 10,3) à 200 µl de la phase aqueuse.

Les quantités de glucuronide de 4MO présentes dans le milieu réactionnel sont directement évaluées par comparaison avec l'intensité de fluorescence d'une gamme étalon réalisée au moyen de quantités croissantes de 1-β-D-glucuronide de 4MO (1 à 25 nmoles, Sigma). Les activités spécifiques sont exprimées en nmol. min⁻¹.mg⁻¹ de protéines.

III.3. Dosage des glucuronosconjugués par CCM couplée à la radiodétection

La quantification des glucuronides d'androstérone et d'acide rétinoïque a été réalisée par CCM couplée à la radiodétection, selon un protocole adapté de Radomska-Pyrek *et al.* (1987) en utilisant les aglycones radiomarqués ou selon un protocole adapté de Bansal & Gessner (1980) en utilisant le [¹⁴C]UDPGA.

III.3.1. Aglycones radiomarqués

La réaction enzymatique consiste à incuber à 37°C, pendant 30 minutes, les protéines (15 à 50 µg), dans 60 µl de tampon 100 mM Tris-HCl (pH 6,5 pour l'androstérone et 7,4 pour l'acide rétinoïque), 5 mM MgCl₂, 0,05 % (p/v) Brij 58 avec les substrats (0,1 mM final, activité spécifique, 9 mCi/mmol, solubilisés sous forme de micelles de substrats radiomarqués et non radiomarqués) et l'UDPGA (4 mM final, solubilisé dans l'eau). La réaction est arrêtée par ajout de 20 µl d'éthanol absolu à 4°C. Les protéines sont centrifugées à 5000 g pendant 10 minutes et 60 µl du milieu réactionnel sont déposés sur des plaques de silice (Baker 250Si-PA (19C) ; VWR Scientific,

Sugarland, TX) pour être soumis à une séparation par CCM. La phase mobile se compose d'un mélange de chloroforme/méthanol/acide acétique glacial/eau (65:25:2:4, v/v).

Les β -D-glucuronides d' $[^3\text{H}]$ androstérone et d' $[^3\text{H}]$ acide rétinolique sont identifiés par autoradiographie des plaques de CCM. Les zones radiomarquées sont grattées, mélangées à 0,5 mL de méthanol et 5 mL d'Ecoscint A (National Diagnostics, Atlanta, GA) puis la radioactivité des échantillons est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Beckman model LS 5000 TD, Beckman Inst., Fullerton, CA). Les activités spécifiques sont exprimées en nmol. min⁻¹.mg⁻¹ de protéines.

III.3.2. $[^{14}\text{C}]$ UDPGA

La réaction enzymatique consiste à incuber à 37°C, pendant 30 minutes, les protéines (15 à 50 μg), dans 40 μl de tampon 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl_2 avec les substrats (0,5 mM final, solubilisés dans le diméthylsulfoxyde) et l'UDPGA froid et radiomarké (0,025 mM final, 250000 dpm, solubilisé dans l'eau). La réaction est arrêtée par ajout de 40 μl d'éthanol absolu à 4°C. Les protéines sont centrifugées à 5000 g pendant 10 minutes et 60 μl du milieu réactionnel sont déposés sur des plaques de silice (Baker 250Si-PA (19C) ; VWR Scientific, Sugarland, TX) pour être soumis à une séparation par CCM. La phase mobile se compose d'un mélange de butanol/acétone/acide acétique glacial/ammoniac 25%/eau (70:50:18:1,5:60, v/v).

Les β -D-glucuronides radiomarqués sont identifiés par autoradiographie des plaques de CCM. Les zones radiomarquées sont grattées, mélangées à 0,5 mL de méthanol et 5 mL d'Ecoscint A (National Diagnostics, Atlanta, GA) puis la radioactivité des échantillons est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Beckman model LS 5000 TD, Beckman Inst., Fullerton, CA). Les activités spécifiques sont exprimées en nmol. min⁻¹.mg⁻¹ de protéines.

III.4. Dosage de la glucuronoconjugaison *in situ*

La mesure de la glucuronoconjugaison du 2-naphtol *in situ* a été réalisée avec des cellules V79 en culture transfectées par l'UGT2B1. Les cellules sont cultivées à subconfluence en milieu DMEM complet sans rouge phénol, de façon à éviter toute interférence avec les méthodes de détection du glucuronide. De plus, les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM complet supplémenté par 5 mM de glucose, de manière à ce que la concentration en UDPGA endogène ne soit pas un facteur limitant pour la réaction enzymatique. Les cellules sont ensuite lavées puis mises en contact avec 1 mM de 2-naphtol (solubilisé dans le diméthylsulfoxyde, volume inférieur à 5% du volume final) pendant 12 heures à 37°C. Un échantillon du milieu extracellulaire est prélevé, acidifié par 50 μl d'HCl 6N, centrifugé à 5000 g pendant 10 minutes et la quantité de glucuronide de 2-naphtol présente dans le milieu est évaluée par CLHP en phase inverse couplée à la spectrophotométrie comme décrit au paragraphe III.1.1.

IV. Western blot et immunofluorescence

IV.1. Anticorps et sérums

IV.1.1. Anticorps anti-UGT

Les anticorps polyclonaux anti-UGT, fournis par le Pr. Brian Burchell (Department of Biomedical Medicine, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, Ecosse), ont été développés chez le mouton et dirigés contre des UGT purifiées à partir de foie de rat. Ces anticorps reconnaissent plusieurs isoformes d'UGT humaines et murines (Coughtrie *et al.*, 1988), dont l'UGT1A6 et l'UGT2B1.

La production des anticorps anti-UGT1A6 a été réalisée au laboratoire par Ouzzine *et al.* (1994). Ce sont des anticorps polyclonaux monospécifiques développés chez le mouton. Ils sont dirigés contre un fragment peptidique de 120 acides aminés de la partie *N*-terminale de l'UGT1A6, exprimé en fusion avec la protéine A de *Staphylococcus aureus* dans la bactérie *Escherichia coli* et purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne IgG-Sepharose.

IV.1.2. Anticorps anti-kétoprofène

La production des anticorps polyclonaux anti-kétoprofène a été réalisée dans le laboratoire du Pr. Etienne Benoît (Laboratoire de Toxicologie et Métabolisme Comparés des Xénobiotiques, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France), selon la méthode utilisée pour la production d'anticorps anti-carprofène décrite par Maire-Gauthier *et al.* (1998). L'immunisation de lapins New-Zealand femelles est réalisée par injection du complexe covalent antigénique thyroglobuline-kétoprofène et les immunoglobulines sont obtenues après purification du plasma des lapins immunisés sur une colonne d'affinité Affi-Gel Protein A mitogen-activated protein II (Bio-Rad ; Ivry-sur-seine, France) et dialyse pendant une nuit à 4°C contre un tampon 0,1 M bicarbonate (pH 8,3), 0,5 M NaCl.

IV.1.3. Sérums

Les sérums de 15 patients atteints d'hépatite virale et de 2 donneurs de sang sains ont été fournis par le Laboratoire d'Immunologie-Pathologie du Centre Hospitalier de Lyon-Sud (Pierre-Bénite, France).

IV.2. Western blot

La séparation des protéines microsomaux (microsomes hépatiques, fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6, V79-UGT2B1 et HK293-UGT2B7) est réalisée par migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant selon la méthode de Laemmli (1970). Les protéines sont généralement solubilisées dans un volume minimal (inférieur à 20 µl) de bleu de dépôt d'électrophorèse de Laemmli (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% sodium dodécyl sulfate (p/v), 20% glycérol (v/v), 10% β-mercaptoéthanol (v/v), et 0,1% bleu de bromophénol (p/v), Sigma). Les gels de concentration utilisés sont constitués de 4% (p/v) d'une solution d'acrylamide/bisacrylamide

et les gels de séparation de 10% (p/v) d'une solution d'acrylamide/bisacrylamide. La coloration des protéines est effectuée si nécessaire après électrophorèse par incubation des gels dans une solution de Bleu de Coomassie.

Le transfert des protéines du gel d'électrophorèse sur une membrane d'Immobilon P® (Millipore, Bedford, USA) est réalisé au moyen d'un appareil de transfert semi-sec (Bio-RAD). La coloration des protéines est obtenue si nécessaire par incubation de la membrane dans une solution de Rouge Ponceau (200 mg de Ponceau S pour 100 mL d'acide trichloroacétique à 3% (v/v)).

L'immunorévélation par les anticorps anti-UGT et anti-kétoprofène est réalisée après saturation de la membrane pendant au moins deux heures dans une solution d'albumine sérique bovine à 3% (p/v) dans un tampon 0,15 M Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM NaCl, 0,5% (v/v) Tween 20. Les anticorps anti-UGT et anti-kétoprofène utilisés sont dilués à 1:3000 (v/v) dans ce tampon. Les anticorps secondaires, anti-mouton ou anti-lapin (Sigma), dilués respectivement au 1:7000 (v/v) et 1:5000 (v/v) dans le même tampon, sont couplés à la phosphatase alcaline. L'immunodétection est réalisée par incubation de la membrane dans une solution de nitrobleu tétrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Sigma) jusqu'à révélation des protéines marquées avec un bruit de fond minimum.

L'immunorévélation par les sérums humains est réalisée après saturation de la membrane pendant une heure dans une solution d'albumine sérique bovine à 3% (p/v). Les sérums utilisés sont dilués à 1:100 (v/v) dans un "phosphate buffer saline" (PBS). Les anticorps secondaires, anti-homme (Sigma), dilués à 1:200 (v/v) dans le PBS, sont couplés à la peroxydase. L'immunodétection est réalisée par incubation de la membrane dans une solution de peroxyde (Sigma) jusqu'à révélation des protéines marquées avec un bruit de fond minimum.

IV.3. Immunofluorescence

Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur des cellules V79 non transfectées ou des cellules V79 exprimant l'UGT2B1, cultivées sur des lamelles de verre. Les cellules sont fixées sur les lamelles avec une solution de *paraformaldéhyde* 2% (p/v, Sigma) dans le PBS pendant 20 minutes, perméabilisées par une solution de saponine 0,2% (p/v, Sigma) dans le PBS pendant 40 minutes, et saturées par une solution de gélatine 0,2% (p/v, Sigma) dans le PBS pendant 30 minutes. Deux anticorps primaires ont été utilisés pour l'immunodétection : les anticorps anti-UGT et les anticorps anti-kétoprofène. Les cellules sont incubées pendant une heure avec les anticorps anti-UGT ou anti-kétoprofène, dilués respectivement à 1:1000 (v/v) et 1:500 (v/v), dans du PBS contenant 0,1% (p/v) de saponine et 1,5% (p/v) d'albumine sérique bovine, puis incubées pendant 30 minutes avec les anticorps secondaires respectifs anti-mouton ou anti-lapin couplés à un fluorophore ("fluorescein isothiocyanate") (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA), dilués au 1:100 (v/v) dans le même tampon. Les protéines immunoréactives sont visualisées au moyen d'un microscope à fluorescence (Nikon UFX-DX, Nikon Corporation, Yokohama Plant, Japon). La photographie des cellules fluorescentes a été réalisée avec des films Kodak Ektachrome 400.

1. Marquage d'affinité

Les expériences de marquage d'affinité ont été réalisées dans le laboratoire du Pr. Anna Radomska-Pandya (UAMS, Little Rock, AR). Trois marqueurs d'affinité ont été utilisés :

- 1) le marqueur d'affinité *o*-UDPGA (figure 8A) qui est un analogue de l'UDPGA réagissant avec des acides aminés lysine,
- 2) la sonde photo-activable [β - 32 P]5N₃UDPGA (figure 8B) qui est également un analogue de l'UDPGA,
- 3) la sonde photo-activable [3 H]acide rétinoïque (figure 8C).

V.1. Marqueur d'affinité *o*-UDPGA

La synthèse chimique de l'*o*-UDPGA, qui consiste à faire réagir l'UDPGA et le périodate de sodium, a été réalisée selon la méthode décrite précédemment par Prehm (1985).

Le marquage d'affinité des protéines par l'*o*-UDPGA est réalisé selon la technique de Battaglia *et al.* (1998). Les fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6 sont diluées à 4,9 mg de protéines/mL dans un tampon 50 mM Hepes (pH 7,4), 0,25 M sachharose, 20 mM MgCl₂. L'expérience est initiée à 25°C par l'addition de l'*o*-UDPGA (2 à 25 mM, solubilisé dans le tampon d'incubation) puis stoppée aux temps indiqués par une dilution (100 fois le volume d'incubation) des protéines dans un tampon 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 20 mM MgCl₂, contenant une concentration de borhydrure de sodium 20 fois supérieure à la concentration d'*o*-UDPGA utilisée. Le dosage de l'activité de glucuronoconjugaison de la 4MO est alors réalisé par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence comme décrit au paragraphe III.2.2.

V.2. Sonde [β - 32 P]5N₃UDPGA

La sonde photo-activable radiomarquée [β - 32 P]5N₃UDPGA (activité spécifique 2-5 mCi/mmol) a été synthétisée comme précédemment décrit par Drake *et al.* (1991).

Le marquage de photo-affinité des protéines par la sonde [β - 32 P]5N₃UDPGA est réalisé selon la technique de Drake *et al.* (1992). Les protéines (microsomes hépatiques humains, fractions membranaires de cellules HK293-UGT2B7, 50 μ g) sont incubées dans la glace, pendant 1 minute, dans un volume final de 40 μ l de tampon 180 mM Tris-HCl (pH 7,4), contenant 28 mM MgCl₂, avec la sonde photo-activable (40 μ M final, 2-5 mCi/ μ mol). Le mélange réactionnel est équilibré pendant 1 minute à température ambiante et irradié pendant 90 secondes sous UV à 254 nm (UVG-11 lamp, Ultraviolet Products, San Gabriel, CA). La réaction est stoppée par addition d'acide trichloracétique 10% (p/v). Les protéines radiomarquées sont centrifugées à 10000 g pendant 5 minutes, séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (conditions décrites au paragraphe IV.2) et localisées par autoradiographie à -80°C.

V.3. Sonde [^3H]acide rétinoïque

Le marquage de photo-affinité des protéines par la sonde [^3H]acide rétinoïque est réalisé selon la technique de Bernstein *et al.* (1995).

Les protéines (fractions membranaires de cellules HK293-UGT2B7, 50 μg) sont incubées à 25°C, pendant 5 minutes, dans un volume final de 40 μl de tampon 180 mM Tris-HCl (pH 7,4), contenant 28 mM MgCl_2 , en présence de la sonde photo-activable (40 μM final, environ 1 mCi par essai). Le mélange réactionnel est irradié pendant 30 minutes sous UV à 366 nm (UVL-21 lamp, Ultraviolet Products). La réaction est stoppée par addition d'acide trichloracétique 10% (p/v). Les protéines radiomarquées sont centrifugées à 10000 g pendant 5 minutes, séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (conditions décrites au paragraphe IV.2) et localisées par autoradiographie à -80°C.

VI. Synthèse des acylglucuronides

VI.1. Glucuronide de kétoprofène

VI.1.1. Synthèse enzymatique

Principe de la méthode

La production de glucuronide de kétoprofène par synthèse enzymatique a été réalisée d'après la technique de Haumont *et al.* (1991).

Le principe général de la méthode consiste à former un bioréacteur en immobilisant des microsomes hépatiques de rat traités au phénobarbital dans un gel, par polymérisation d'une solution d'alginate en présence de cations divalents (ions magnésium). L'incubation des billes contenant les microsomes immobilisés avec de l'UDPGA et un aglycone déterminé permet de produire des quantités de 1- β -D-glucuronide de l'ordre de quelques dizaines de milligrammes. Les paramètres d'incubation tels que le pH du milieu, le temps d'incubation et les concentrations en cosubstrat et en aglycone, ont été déterminés dans le but d'optimiser les conditions de production du 1-O-acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène et de limiter les phénomènes d'hydrolyse et d'acylmigration.

Protocole expérimental

Le bioréacteur consiste à incuber, sous agitation pendant deux heures à 37°C, dans un volume final de 1,3 mL de tampon 100 mM acétate de sodium (pH 5,4), contenant 10 mM de MgCl_2 , les microsomes hépatiques de rat immobilisés dans les billes d'alginate, avec 10 mM de RS-kétoprofène (solubilisé dans un volume minimal de diméthylsulfoxyde) et 10 mM d'UDPGA (directement ajoutés dans le milieu d'incubation), en présence de 100 mM de saccharonolactone (inhibiteur des β -glucuronidases actives à pH acide). A la fin de la réaction, le surnageant est séparé des billes et acidifié par un volume égal de tampon 0,4 M acide trichloracétique, 0,6 M glycine (pH 2,2).

Etant donné leur caractère très hydrophile, les glucuronides R et S de kétoprofène sont ensuite purifiés par CLHP semi-préparative en phase inverse sur une colonne Lichrosorb RP18, 7 μm , 250 x

5 mm (Merck), dans les conditions décrites précédemment par Chakir *et al.* (1994). La phase mobile est composée d'un mélange acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique 40:60:0,04 (v/v), le débit de la phase mobile est de 2,5 mL/min et la détection est réalisée à 256 nm. Au temps de rétention des glucuronides, l'éluant est récupéré et évaporé au moyen d'un évaporateur rotatif. L'extrait sec des glucuronides est repris à froid dans un volume de méthanol puis aliquoté. La durée de l'aliquotage est suffisamment rapide pour éviter toute dégradation des glucuronides dans le méthanol. Le méthanol est ensuite évaporé sous azote et les glucuronides sont conservés à sec à -20°C.

VI.1.2. Synthèse chimique

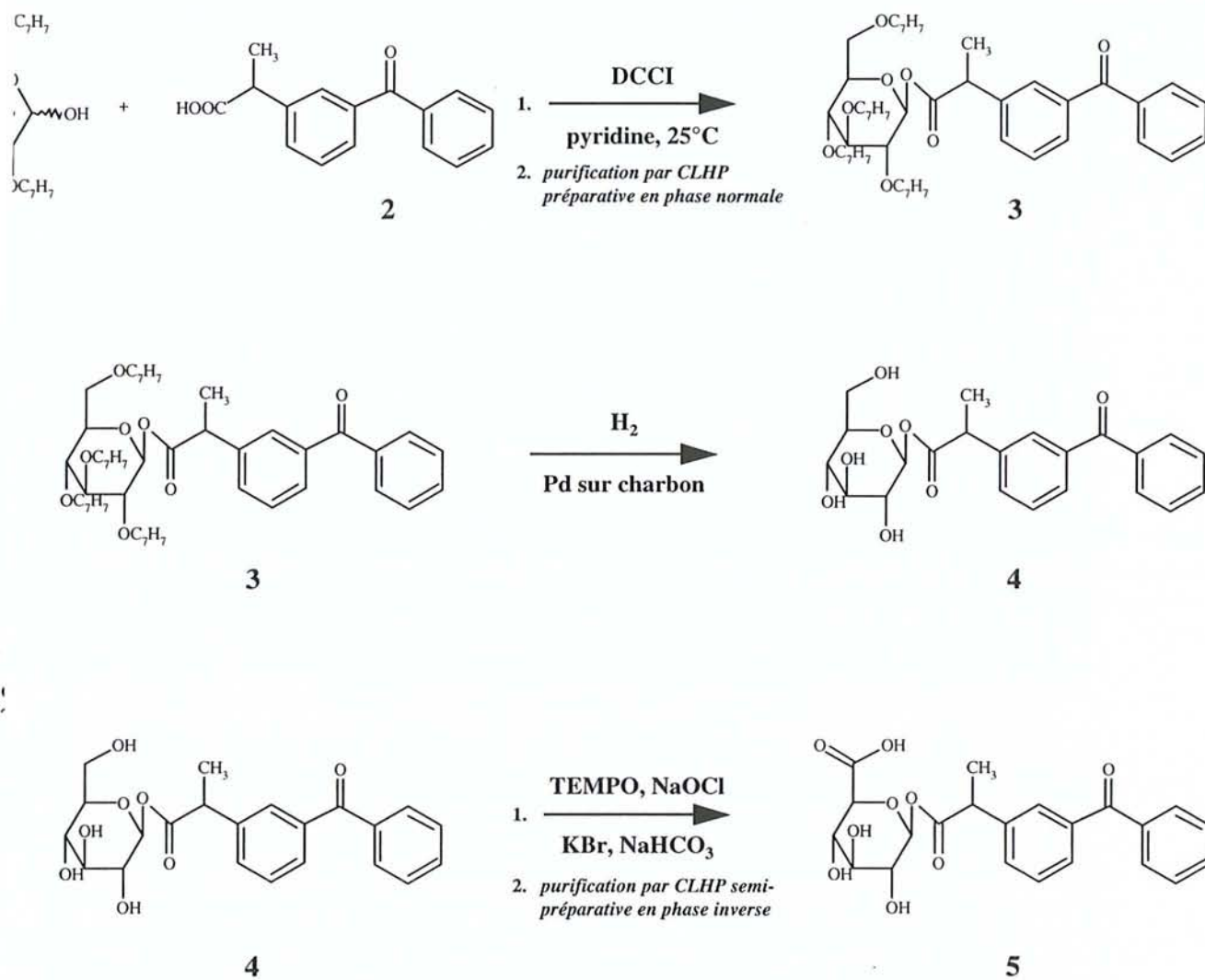
Nous avons réalisé la synthèse chimique du 1-*O*-acyl-β-D-glucuronide de kétoprofène en collaboration avec le Dr. Françoise Chrétien dans le laboratoire du Dr. Yves Chapleur (Laboratoire de Méthodologie et Synthèse Enantiospécifique de Biomolécules, Faculté des Sciences, Vandœuvre-lès-Nancy).

Le principe des trois étapes de la synthèse chimique du 1-*O*-acyl-β-D-glucuronide de kétoprofène est représenté sur la figure 19.

La solution 1 (1 mmole de *RS*-kétoprofène dans 4 mL de dichlorométhane sec) est ajoutée goutte à goutte à la solution 2 (1 mmole de tétra-*O*-benzyl-D-glucose et 1 mmole de DCCI dans 1,5 mL de dichlorométhane sec et 0,1 mL de pyridine) (figure 19A). Le mélange réactionnel est agité pendant 12 heures à 25°C. Après évaporation complète des solvants organiques, les produits de la réaction sont repris dans 2 mL de dichlorométhane et purifiés par CLHP préparative en phase normale. La colonne préparative Axxial, de diamètre 20 mm (Instrulab, Châteauneuf-lès-Martigues, France), est réalisée avec un gel de silice 60H (5-40 μm, Merck) comprimé à 8 bars. La phase mobile est composée d'un mélange hexane/acétate d'éthyle 9:1 (v/v) et le débit de la phase mobile est d'environ 6 mL/min. La séparation des produits est suivie par CCM, sur des plaques de silice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). La détection des produits est réalisée par observation des plaques sous UV et/ou par pulvérisation d'une solution d'acide sulfurique 18N dans le méthanol suivie d'un chauffage à 270°C. Les produits purifiés sont ensuite évaporés, puis repris dans du méthanol deutérié pour être analysés et identifiés par RMN ¹H. Les spectres RMN ¹H sont effectués sur un appareil Bruker AC 250 (250 MHz, Fallanden, Suisse). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm, par rapport au tétraméthylsilane comme étalon interne.

Du palladium activé sur charbon (100 mg) est ensuite ajouté à une solution de l'anomère β de 2,3,4,6-tétra-*O*-benzyl-1-*O*-kétoprofényle-D-glucuronide précédemment purifié (figure 19B). Le mélange réactionnel est agité sous hydrogène à pression atmosphérique pendant deux heures. Le milieu réactionnel est séparé du palladium activé sur charbon par filtration puis évaporé au moyen d'un évaporateur rotatif.

Le produit de la réaction est solubilisé dans environ 1 mL de carbonate de sodium auquel sont ajoutés le TEMPO (1,3 mg) et le bromure de potassium (1,4 mg). La solution est placée sous agitation à 0°C. 70 μl d'une solution d'hypochlorite de sodium à 5,25% sont alors ajoutés goutte à goutte au mélange réactionnel (figure 19C). Après deux heures de réaction, le milieu de synthèse est lyophilisé. Les produits de la réaction sont alors séparés par CLHP semi-préparative en phase inverse sur une



2, 3, 4, 6-tétra-*O*-benzyl-D-glucose

RS-kétoprofène

2, 3, 4, 6-tétra-*O*-benzyl-1-*O*-kétoprofényle-β-D-glucose

1-*O*-kétoprofényle-β-D-glucose

1-*O*-kétoprofényle-β-D-glucuronide

Figure 19. Principe de la synthèse chimique
 de 1-*O*-acetyl-β-D-glucuronide de kétoprofène.

colonne Lichrosorb RP18, 7 μ m, 250 x 5 mm (Merck). La phase mobile est composée d'un mélange acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique 40:60:0,04 (v/v), le débit de la phase mobile est de 2,5 mL/min et la détection est réalisée à 256 nm. Les produits ainsi séparés sont collectés, lyophilisés et conservés à -20°C.

VI.1.3. Identification et caractérisation du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène

L'identification des glucuronides de kétoprofène est réalisée par CLHP analytique et la caractérisation de la forme 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide est effectuée par RMN ^1H .

L'identification des glucuronides de kétoprofène par CLHP analytique en phase inverse est réalisée après analyse d'une fraction des milieux de synthèse enzymatique et chimique sur une colonne Lichrospher RP18, 5 μ m, 250 x 4 mm (Merck). Les conditions chromatographiques sont les suivantes : la phase mobile est composée d'un mélange acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique (35:65:0,04, v/v), le débit de la phase mobile est de 0,8 mL/min et la détection est réalisée sur un détecteur spectrophotométrique à barrette de diodes (996, Waters, Milford, MA), piloté par le logiciel Millenium installé sur PC (Digital), balayant les longueurs d'onde de 200 nm à 400 nm. Les quantités de glucuronides de kétoprofène ou de kétoprofène seul injectés sur la colonne sont directement évaluées par comparaison avec une gamme étalon réalisée au moyen de quantités croissantes en kétoprofène (0,01 à 5 nmoles).

Les spectres RMN ^1H des glucuronides de kétoprofène synthétisés par voies enzymatique et chimique sont réalisés après reprise d'une fraction de l'extrait sec des glucuronides dans du méthanol deutérié.

VI.2. Glucuronide d'acide rétinoïque tout-trans

La synthèse chimique du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* a été réalisée selon un procédé décrit précédemment, qui consiste à faire réagir le sel de tétrabutylammonium d'acide glucuronique avec l'acide rétinoïque tout-*trans* via le dérivé imidazole ou triazole (Becker *et al.*, 1996). La pureté du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* a été évaluée par CLHP en phase inverse et par spectrométrie de masse.

VI.3. Glucuronide d'acide lithocholique

La synthèse chimique du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide d'acide lithocholique a été réalisée selon une méthode chimique décrite par Panfil *et al.* (1992). La pureté du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide d'acide lithocholique a été évaluée par CLHP en phase inverse et par spectrométrie de masse.

III. Etude de la réactivité des acylglucuronides avec les UGT

VII.1. Glucuronide de kétoprofène

VII.1.1. Inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison *in vitro*

Le protocole d'étude *in vitro* de l'inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison par le glucuronide de kétoprofène est représenté sur la figure 20.

L'expérience est réalisée à 25°C, dans le tampon 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂ en présence de 5 mM de saccharonolactone, par incubation (5 à 30 minutes) de différentes sources biologiques d'UGT avec des concentrations croissantes en glucuronide de kétoprofène (0 à 5 mM). Après 30 minutes de centrifugation à 100000 g, le culot protéique est lavé deux fois avec 200 µl de tampon 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂ de façon à éliminer le glucuronide de kétoprofène non fixé de manière covalente aux protéines, puis repris par 350 µl du même tampon. Nous avons vérifié que ces lavages ménagés du culot protéique sont suffisants pour réduire la concentration en glucuronide de kétoprofène fixé réversiblement à une concentration non inhibitrice. La glucuronoconjugaison catalysée par les protéines éventuellement modifiées est alors évaluée par CLHP couplée à la spectrophotométrie dans les conditions décrites au paragraphe III.1.1, en utilisant le 1- et 2-naphtol comme aglycones. Une expérience contrôle sans glucuronide de kétoprofène est réalisée dans les mêmes conditions et correspond à 100 % d'activité.

La formation des adduits par fixation irréversible du glucuronide de kétoprofène sur les protéines microsomales est quantifiée par hydrolyse chimique des protéines. Une aliquote de protéines est hydrolysée par la soude 2N à 65°C (4 à 12 heures). Le kétoprofène éventuellement libéré après hydrolyse est extrait deux fois en milieu acide par 1 mL d'éther, récupéré dans la phase organique évaporée sous azote et repris dans de l'acétonitrile pour être dosé par CLHP en phase inverse comme décrit au paragraphe VI.1.3.

VII.1.2. Identification des protéines adduites par Western blot

Les protéines sont incubées à 25°C pendant 4 heures avec le glucuronide de kétoprofène (0 à 2,5 mM) dans 100 µl de tampon 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, en présence de 5 mM de saccharonolactone et de 7 mM de cyanure de sodium (Sigma). La précipitation des protéines est obtenue par addition de 10% (v/v) d'acide trichloracétique, suivie d'une centrifugation à 13000 g pendant 10 minutes. Les protéines sont alors lavées avec 500 µl d'un mélange méthanol/éther 3:1 (v/v), solubilisées dans un volume minimal de bleu de dépôt d'électrophorèse de Laemmli et conservées à -20°C avant d'être analysées par Western blot au moyen d'anticorps anti-UGT et anti-kétoprofène, comme décrit au paragraphe IV.2.

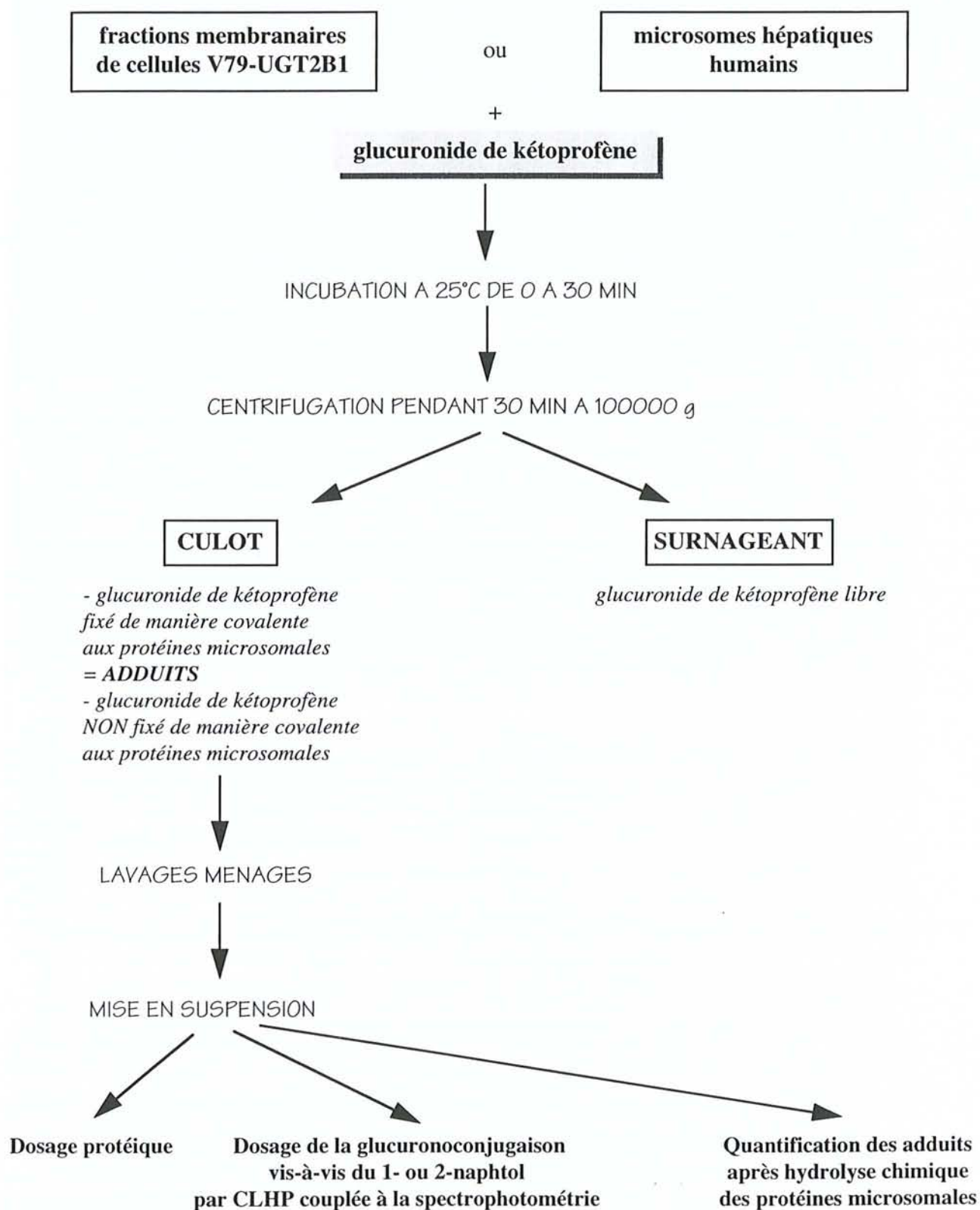


Figure 20. Protocole d'étude de l'inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison par le glucuronide de kétoprofène in vitro.

VII.1.3. Purification d'UGT adduites

La formation des protéines adduites est réalisée par incubation, à 25°C, pendant 4 heures, de microsomes hépatiques de rat traités au phénobarbital (10 mg) avec 5 mM de glucuronide de kétoprofène, dans 8 mL de tampon 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂ en présence de 5 mM de saccharonolactone et de 5 mM de cyanure de sodium. Les microsomes contenant les protéines adduites sont solubilisés à 4°C pendant 30 minutes par addition d'un détergent (3-[(3-chloroamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), Sigma, concentration finale 1 mg de détergent/mg de protéine), le pH du mélange protéique est ajusté à 9,1 avec une solution de Tris 1M. Une centrifugation du mélange protéique à 100000 g pendant 30 minutes permet de récupérer les protéines solubilisées dans le surnageant.

La purification des UGT est alors réalisée d'après la méthode de Coffman *et al.* (1996). Les protéines solubilisées sont déposées sur une colonne diéthylaminoéthyl-Sepharcel (Sigma, 5 cm, 1 cm de diamètre), équilibrée à 4°C avec 50 mL de tampon 25 mM Tris-acétate (pH 9,1), 0,1 mM éthylènediamine tétraacétate, 1 mM dithiotréitol, 20% glycérol (v/v) et 175 µg/mL d'azolectine (Sigma). Les protéines fixées aspécifiquement sont éliminées par lavage de la colonne avec 20 mL de tampon d'équilibration et les protéines sont ensuite éluées par le tampon d'équilibration contenant 50 mM de KCl jusqu'à ce que l'absorbance lue à 280 nm soit de l'ordre de 0 (figure 21). Des fractions de 2,4 mL sont collectées et analysées par Western blot, comme décrit au paragraphe IV.2, en utilisant des anticorps anti-UGT et anti-kétoprofène.

Les fractions contenant les protéines immunoréactives sont ensuite dialysées une nuit à 4°C contre un tampon 25 mM Tris-acétate (pH 7,5), 0,1 mM éthylènediamine tétraacétate, 1 mM dithiotréitol, 20% glycérol (v/v), et 1% CHAPS (p/v) puis déposées sur une colonne Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède, 5 cm, 1 cm de diamètre), équilibrée avec le même tampon. La colonne est lavée par deux volumes de colonne de tampon d'équilibration et les protéines accrochées sont éluées avec 50 mL d'un gradient de 0 à 0,5 M de NaCl. Des fractions de 2,4 mL sont collectées et analysées par Western blot, comme décrit au paragraphe IV.2, en utilisant des anticorps anti-UGT et anti-kétoprofène.

VII.1.4. Marquage de photo-affinité des UGT adduites avec la sonde [β -³²P]5N₃UDPGA

Les protéines sont incubées à 25°C pendant 30 minutes avec le glucuronide de kétoprofène (0 à 5 mM) dans 100 µl de tampon 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, en présence de saccharonolactone (5 mM). L'inactivation est arrêtée par une dilution (25 fois) des protéines dans le tampon 1 mM Hepes (pH 7,4), 0,25 M saccharose. Les protéines sont ensuite centrifugées à 100000 g pendant 30 minutes à 4°C et solubilisées dans un volume minimal de tampon 180 mM Tris-HCl (pH 7,4), contenant 28 mM MgCl₂, pour être finalement soumises à la technique de marquage de photo-affinité avec la sonde [β -³²P]5N₃UDPGA, comme décrit au paragraphe V.2.

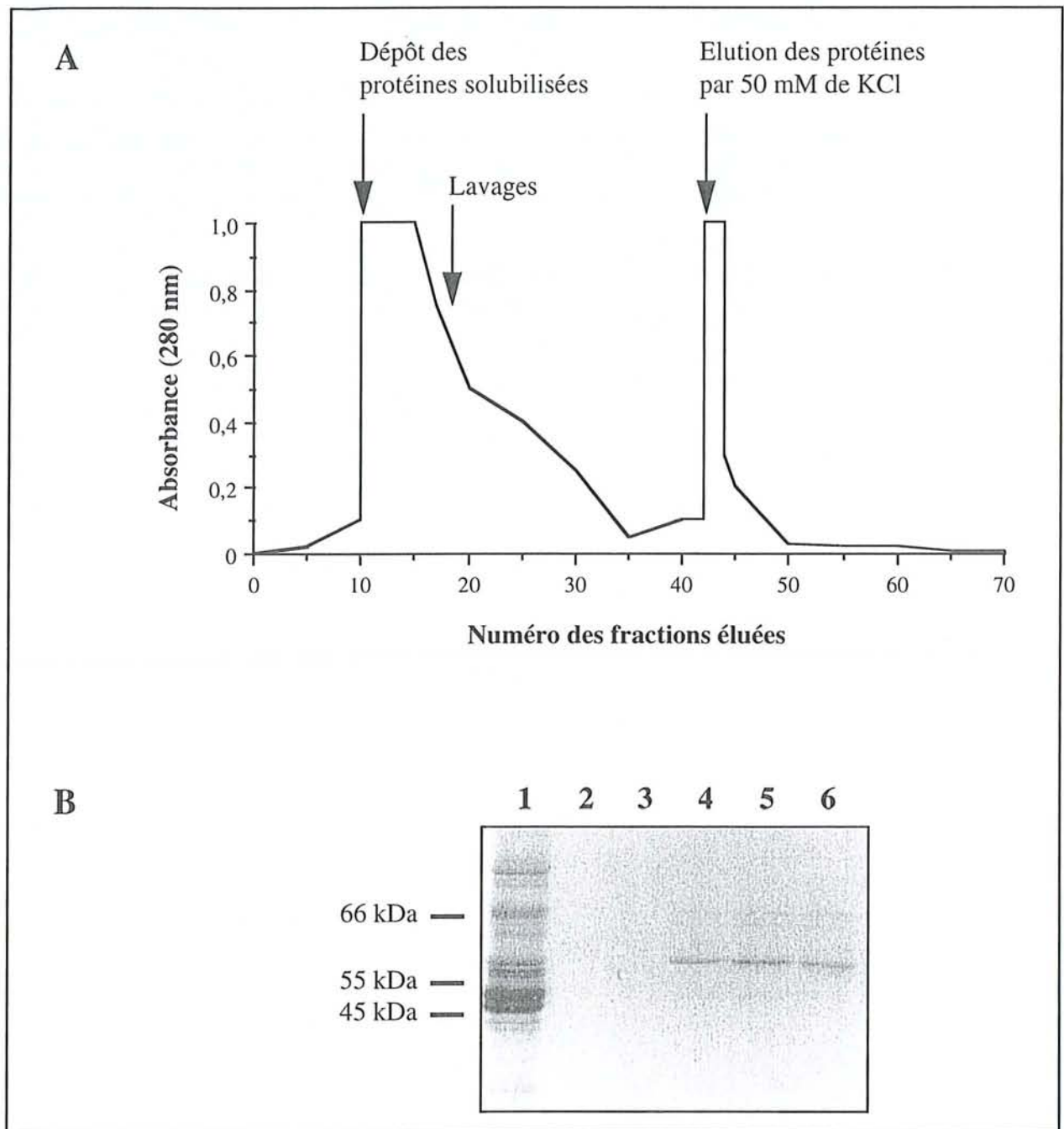


Figure 21. Purification d'UGT adduites sur colonne échangeuse d'ions.

La formation des adduits est réalisée comme décrit au chapitre *Matériel et Méthodes*.

A. Profil d'élution des fractions protéiques sur colonne diéthylaminoéthyl-Sepharose.

Les protéines adduites solubilisées (panneau B, puits 1) sont déposées sur une colonne diéthylaminoéthyl-Sepharose, équilibrée à 4°C avec 50 mL de tampon 25 mM Tris-acétate (pH 9,1), 0,1 mM éthylènediamine tétraacétate, 1 mM dithiothréitol, 20% glycérol (v/v) et 175 µg/mL d'azolectine. Une fois les protéines accrochées sur la colonne, celle-ci est lavée avec 20 mL de tampon d'équilibration (panneau B, puits 2 et 3) et les protéines sont ensuite éluées avec le tampon d'équilibration contenant 50 mM de KCl jusqu'à ce que l'absorbance lue à 280 nm soit de l'ordre de 0 (panneau B, puits 4 à 6).

B. Séparation électrophorétique des fractions protéiques sur gel de polyacrylamide et coloration des protéines au bleu de Coomassie.

VII.1.5. Formation d'adduits *in situ*

La formation de protéines adduites *in situ* est réalisée sur des cellules V79 en culture non transfectées et exprimant l'UGT2B1. Les cellules, cultivées à 50% de confluence environ dans le milieu DMEM complet, sont lavées au PBS, puis traitées pendant 24 heures à 37°C par 1 mM d'acide *n*-butyrique (sel de sodium) et 5 mM de glucose. Ensuite, les cellules sont lavées puis mises en contact avec du diméthylsulfoxyde (volume inférieur à 2,5% du volume final) ou avec 1 mM de kétoprofène (solubilisé dans le diméthylsulfoxyde, volume inférieur à 2,5% du volume final) pendant 24 heures à 37°C en présence ou non d'acide 7,7,7 triphénylheptanoïque, un inhibiteur des UGT (1 mM final, solubilisé dans le diméthylsulfoxyde, volume inférieur à 2,5% du volume final). Le milieu de culture est alors prélevé, acidifié par 50 µl d'HCl 6N, centrifugé à 5000 g pendant 10 minutes et la quantité de glucuronide de kétoprofène synthétisé par les cellules est mesurée par CLHP couplée à la spectrophotométrie. Deux types d'expériences ont alors été réalisées : l'évaluation de la glucuronoconjugaison catalysée *in situ* par les protéines éventuellement modifiées et la détection des protéines adduites par immunofluorescence.

VII.1.5.1. Inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison *in situ* dans les cellules en culture

La glucuronoconjugaison du 2-naphtol *in situ* est évaluée comme décrit au paragraphe III.4. La formation d'adduits est également quantifiée par hydrolyse des cellules grattées par la soude 2N à 65°C (4 heures). Le kétoprofène éventuellement libéré après hydrolyse est extrait deux fois en milieu acide par 1 mL d'éther, récupéré dans la phase organique évaporée sous azote et repris dans de l'acétonitrile pour être dosé par CLHP en phase inverse, comme décrit au paragraphe VI.1.3.

VII.1.5.2. Identification des protéines adduites *in situ* par immunofluorescence

Les adduits formés *in situ* sont visualisés par immunofluorescence au moyen d'anticorps anti-UGT et anti-kétoprofène comme indiqué au paragraphe IV.3.

VII.2. Acides gras, acyl CoA et kétoprofényl CoA

VII.2.1. Inhibition réversible par les acides gras et leurs acyl CoA correspondants

L'inhibition réversible de la glucuronoconjugaison dans les microsomes hépatiques (homme ou rat) ou les fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6 ou V79-UGT2B1 par l'acide octanoïque, l'acide palmitique, l'acide oléique, le CoA, l'octanoyl CoA, le palmitoyl CoA et l'oléoyl CoA est évaluée comme suit.

L'expérience est réalisée à 37°C dans le tampon d'activité enzymatique, en présence des protéines (25 µg de microsomes hépatiques humains, 10 µg de fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6, 50 µg de fractions membranaires de cellules V79-UGT2B1), de l'inhibiteur à des concentrations variables (0 à 4 mM), d'UDPGA à une concentration finale de 2 mM, du substrat de la

réaction à une concentration finale de 1 mM et dans le cas du dosage de l'activité kétoprofène, de 4 mM de saccharonolactone. Les dosages d'activité enzymatique sont réalisés par CLHP couplée à la spectrophotométrie ou par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence selon les conditions décrites aux paragraphes III.1 et III.2, respectivement. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle (activité spécifique de l'enzyme en présence d'inhibiteur/activité spécifique native de l'enzyme x 100).

VII.2.2. Inhibition irréversible par le palmitoyl CoA et le kétoprofényle CoA

L'expérience est réalisée à 25°C, dans le tampon 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂ en présence de 5 mM de saccharonolactone, par incubation, de 0,5 à 30 minutes, des UGT (microsomes hépatiques humains et fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6 et V79-UGT2B1) avec des concentrations croissantes en palmitoyl CoA et en kétoprofényle CoA (0 à 5 mM). Les incubations sont arrêtées par une dilution des protéines (100 fois) dans le même tampon et l'activité catalytique des protéines éventuellement modifiées est évaluée par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence en utilisant le 1-naphtol comme aglycone (paragraphe III.2.1). Une expérience contrôle sans inhibiteur est réalisée dans les mêmes conditions et correspond au 100 % d'activité.

VII.3. Acide rétinoïque tout-trans et acide lithocholique

VII.3.1. Inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison in vitro

L'expérience est réalisée à 25°C, dans le tampon 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, en présence de 5 mM de saccharonolactone, par incubation, de 5 à 30 minutes, des UGT (microsomes hépatiques humains, fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6 et HK293-UGT2B7) avec des concentrations croissantes en acylglucuronides d'acide rétinoïque tout-*trans* et d'acide lithocholique (0,5 à 5 mM), solubilisés sous forme de micelles avec du Brij 58 (concentration finale de détergent, 0,05% (p/v)). Les incubations sont arrêtées par une dilution des protéines (100 fois) dans le tampon d'inactivation et l'activité catalytique des protéines éventuellement modifiées est évaluée par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence en utilisant la 4MO comme aglycone (paragraphe III.2.2) ou par CCM couplée à la radiodétection en utilisant l'androstérone comme aglycone (paragraphe III.3.1). Une expérience contrôle sans inhibiteur est réalisée dans les mêmes conditions et correspond à 100 % d'activité.

VII.3.2. Marquage de photo-affinité des UGT modifiées par le glucuronide d'acide lithocholique avec la sonde [β -³²P]5N₃UDPGA

Les protéines sont incubées à 25°C pendant 30 minutes avec le glucuronide d'acide lithocholique (0 et 5 mM) dans 100 μ l de tampon 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂. L'incubation est arrêtée par une dilution (10 fois) des protéines dans le tampon 1 mM Hepes (pH 7,4), 0,25 M saccharose qui sont ensuite centrifugées à 100000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les

ulots protéiques sont solubilisés dans un volume minimal de tampon 180 mM Tris-HCl (pH 7,4) contenant 28 mM de $MgCl_2$ puis soumis au marquage de photo-affinité avec la sonde [β - ^{32}P]5N₃UDPGA comme décrit au paragraphe V.2.

VII.4. Détermination des paramètres cinétiques des inhibitions par les acylglucuronides

Afin de déterminer les paramètres cinétiques des inhibitions par les acylglucuronides et les acyl CoA, l'activité enzymatique est évaluée à des concentrations variables en inhibiteur et en UDPGA ou en aglycone.

La valeur de la concentration en inhibiteur pour laquelle l'activité enzymatique résiduelle est égale à 50% de l'activité enzymatique initiale (CI_{50}) est déterminée d'après la représentation de l'activité résiduelle (%) en fonction de la concentration en inhibiteur.

Le mode d'inhibition est déterminé par la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk. L'activité enzymatique spécifique est évaluée pour des concentrations en aglycone comprises entre 0 et 5 mM et pour des concentrations en inhibiteur qui encadrent la valeur de CI_{50} précédemment déterminée. La valeur de la constante apparente d'inhibition (K_i) est ensuite déterminée graphiquement par la représentation secondaire des pentes des droites d'inhibition (K_m / V_{max}) en fonction de la concentration en inhibiteur (Segel, 1975).

VIII. Marquage de photo-affinité des CRABP avec la sonde [3H]acide rétinoïque

Le marquage de photo-affinité des CRABP I et II est réalisé avec la sonde [3H]acide rétinoïque selon une méthode adaptée de Bernstein *et al.* (1995). Les CRABP I et II (0,45 μg) sont incubées pendant deux minutes dans la glace, dans un volume final de 10 μl de tampon 50 mM Hepes-NaOH (pH 7,5), en présence des ligands potentiels (dérivés de l'acide rétinoïque tout-*trans* ou autres composés, 0 à 125 μM , solubilisés dans l'éthanol, volume égal à 5% du volume final) et de la sonde photo-activable (3,3 μM final, solubilisée dans le méthanol, volume égal à 5% du volume final). Le mélange réactionnel est équilibré pendant cinq minutes dans la glace puis irradié pendant 15 minutes sous lampe UV (Spectroline model ENF-260C ; Spectronics Corp., Westbury, NY) à 354 nm. La réaction est stoppée par addition de 4 μl de tampon de dénaturation NuPAGE® (Novex, San Diego, CA). Les protéines radiomarquées sont soumises à une sonication pendant trois minutes, dénaturées à 100°C pendant cinq minutes, séparées par électrophorèse sur gel 4-12% Bis-Tris NuPAGE (Novex) dans les conditions indiquées par le fabricant et localisées par autoradiographie à -80°C.

IX. Modification des UGT par des agents chimiques

IX.1. Modification par les agents spécifiques des acides aminés carboxyliques

La modification chimique est effectuée par des inhibiteurs irréversibles spécifiques des acides carboxyliques : le DCCI, l'EDC et le WK (figure 22A).

Les fractions membranaires de cellules HK293 transfectées par l'UGT2B7 humaine sont diluées à 5,7 mg de protéines/mL dans un tampon 50 mM phosphate sodium/potassium, 5 mM $MgCl_2$, pH 6,0 pour l'inactivation avec le WK et pH 5,0 pour l'inactivation avec les dérivés carbodiimides. Les solutions de WK sont préparées dans HCl 1 mM (2% final, v/v) et les solutions de dérivés carbodiimides dans le diméthylsulfoxyde (5% final, v/v). Les expériences sont initiées à 25°C par l'addition des agents chimiques (0,2 à 12 mM selon l'agent utilisé). Les manipulations de protection contre l'éventuelle inactivation par le WK sont également réalisées en incubant les protéines dans les mêmes conditions avec des concentrations croissantes en UDPGA, androstérone et acide rétinolique pendant 5 minutes à température ambiante avant incubation pendant 1 minute avec 2 mM de WK. Les incubations sont stoppées aux temps indiqués par une dilution (10 fois le volume d'incubation) des protéines modifiées dans le tampon 180 mM Tris-HCl, 28 mM $MgCl_2$, 5 mM acide glutamique, pH 6,5 pour l'androstérone ou 7,4 pour l'acide rétinolique. Le dosage de l'activité de glucuronoconjugaison de l'androstérone et de l'acide rétinolique est alors réalisé comme décrit au paragraphe III.3.

IX.2. Modification par les agents spécifiques des cystéines

La modification chimique est effectuée par des inhibiteurs irréversibles spécifiques des groupements cystéines : le *N*-éthylmaléimide, le *N*-phénylmaléimide, l'acide iodoacétique, l'acide 2-(5,5'-dithiobis)nitrobenzoïque et le *S*-méthyl méthaneethiosulfonate (figure 22B).

Les fractions membranaires de cellules V79 transfectées par l'UGT1A6 humaine sont diluées à 1,3 mg de protéines/mL dans un tampon 50 mM phosphate sodium/potassium (pH 7,0), 5 mM $MgCl_2$. L'expérience est initiée à 25°C par l'addition des agents chimiques (0 à 15 mM, solubilisés dans le diméthylsulfoxyde, volume inférieur à 5% du volume final) puis stoppée aux temps indiqués par une dilution (50 fois le volume d'incubation) des protéines modifiées dans le même tampon phosphate. Le dosage de l'activité de glucuronoconjugaison de la 4MO est alors réalisé par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence comme décrit au paragraphe III.2.2.

IX. 3. Détermination des paramètres cinétiques des inactivations par les agents chimiques

Afin de déterminer les paramètres cinétiques des réactions d'inactivation par les agents chimiques et de définir le nombre de résidus d'acides aminés essentiels modifiés, les enzymes (UGT2B7 ou UGT1A6) sont incubées avec les inhibiteurs irréversibles à différentes concentrations

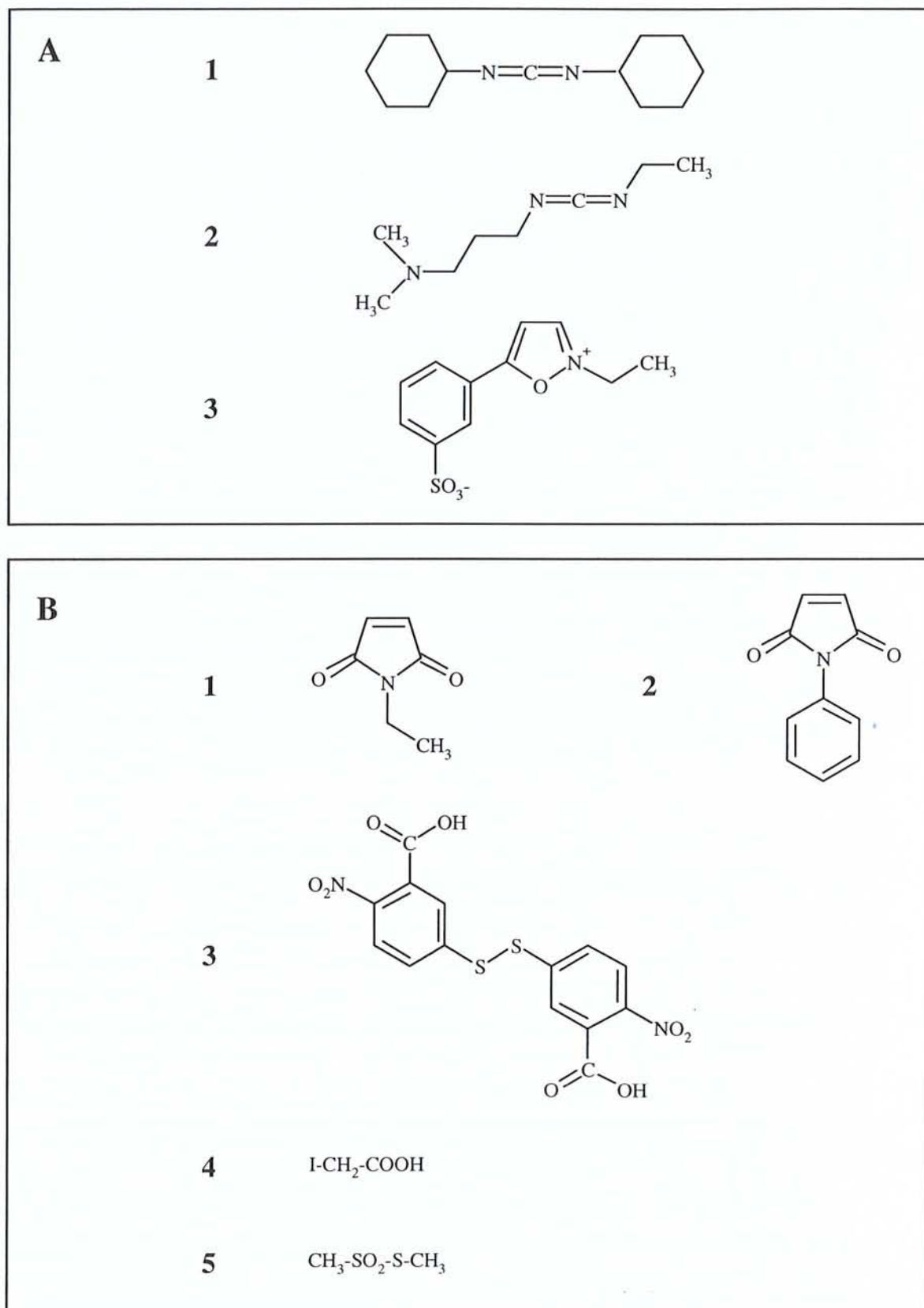


Figure 22. Structure des agents de modification chimique des acides aminés.

A. Modification des acides carboxyliques.

1, DCCI ; 2, EDC ; 3, WK.

B. Modification des cystéines.

1, *N*-éthylmaléimide ; 2, *N*-phénylmaléimide ; 3, Acide 2-(5,5'-dithiobis)nitrobenzoïque ;

4, Acide iodoacétique ; 5, *S*-méthyl méthaneethiosulfonate.

pendant des temps variables. Dans le cas où les représentations semi-logarithmiques des activités résiduelles (A) en fonction du temps d'inactivation (t) sont linéaires, le processus d'inactivation suit une cinétique de pseudo premier-ordre qui obéit à l'équation :

$$\text{Log } A/A_0 = - K_{\text{obs}} \times t$$

où A_0 représente l'activité totale, A l'activité résiduelle à un temps t d'inactivation et K_{obs} la constante d'inactivation de l'enzyme pour une concentration en agent modifiant (AM) donnée. La constante d'inactivation de deuxième ordre de la réaction (k_i) est déterminée grâce à la représentation logarithmique de K_{obs} en fonction de la concentration en agent modifiant répondant à l'équation suivante où n correspond à l'ordre de la réaction (Segel, 1975) :

$$-\text{Log } K_{\text{obs}} = - n \cdot \text{Log } (\text{AM}) - \text{Log } k_i$$

X. Mutagenèse dirigée

L'ADNc codant pour l'UGT1A6 a été précédemment sous-cloné dans les sites *HindIII* - *XbaI* du vecteur pCDNA1.1 (Ouzzine *et al.*, 1994). Ce plasmide a été employé comme matrice pour réaliser la mutagenèse dirigée de la cystéine 126 en valine et en sérine par "polymerase chain reaction". Pour ce faire, une amorce "sens" comprenant la séquence immédiatement en amont du codon d'initiation de la traduction, et une amorce antisens permettant la modification du codon TGC de la cystéine en codon TCC (valine) ou TTG (sérine) et la création d'un site unique de restriction *Sse83571* ont été utilisés. Les fragments mutés obtenus ont ensuite été sous-clonés dans le vecteur pCR2.1 (Invitrogen) puis digérés par *Bsu361* et *Sse83571* et introduits dans le vecteur initial pCDNA1.1-UGT1A6 par échange de brins.

Les UGT mutées ont été exprimées de façon stable dans les cellules V79 de manière analogue à l'enzyme sauvage (Fournel-Gigleux *et al.*, 1991).

Chapitre 4. Résultats et discussion

Chapitre 4. Résultats et Discussion

1. Réactivité des acylglucuronides

1.1. Synthèse de glucuronide de kétoprofène

Nous avons, en premier lieu, réalisé la synthèse du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène par une méthode enzymatique initialement développée au laboratoire pour synthétiser le glucuronide d'AZT (Haumont *et al.*, 1990). La production de 1- β -D-glucuronide par synthèse enzymatique est cependant limitée d'un point de vue quantitatif. Sur la base d'un travail qui décrit la production de 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* par synthèse chimique avec un rendement supérieur à 80% (Becker *et al.*, 1996), nous avons cherché à développer une méthode analogue de synthèse chimique du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène. La description et la comparaison des méthodes enzymatique et chimique sont l'objet de ce paragraphe.

1.1.1. Principe de la synthèse enzymatique

La préparation de 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène par synthèse enzymatique en milieu semi-liquide (enzymes immobilisées) nécessite trois principales étapes.

1) Immobilisation des UGT dans les billes d'alginate.

Cette étape, simple, consiste à emprisonner des microsomes hépatiques de rats traités au phénobarbital dans un gel, par polymérisation d'une solution d'alginate en présence de cations divalents (ions magnésium). Ce procédé permet la libre diffusion des substrats (aglycone et UDPGA) et des produits de la réaction de glucuronoconjugaison (glucuronides).

2) Production de glucuronide par incubation des UGT immobilisées dans les billes d'alginate, avec l'aglycone et le cosubstrat de la réaction enzymatique, l'UDPGA.

Le rendement de production des glucuronides dépend de l'activité catalytique des UGT vis-à-vis de l'aglycone considéré. Les conditions d'incubation des UGT immobilisées dans les billes d'alginate avec le RS-kétoprofène et l'UDPGA (concentrations en substrat et cosubstrat de 10 mM, pH 5,4, deux heures d'incubation en présence de saccharonolactone) ont été déterminées de manière à optimiser le rendement de production et à limiter les phénomènes de dégradation du glucuronide de kétoprofène synthétisé. Ainsi, 1,5 mg de glucuronide de kétoprofène est synthétisé, après une incubation de deux heures, à partir de 10 mg de RS-kétoprofène, soit un rendement d'environ 15%.

3) Purification du glucuronide par CLHP semi-préparative en phase inverse.

Les produits à séparer étant peu nombreux (aglycone, glucuronide, UDPGA) et ayant des propriétés chromatographiques différentes (glucuronide hydrophile, aglycone hydrophobe), la purification par CLHP permet d'isoler le glucuronide des autres produits de la réaction avec une pureté supérieure à 98%. La glucuronoconjugaison de RS-kétoprofène conduit à la formation d'un mélange des deux diastéréoisomères *R* et *S* de 1-*O*-acyl- β -D-glucuronides de kétoprofène. L'optimisation des conditions

chromatographiques de purification résulte d'un compromis entre la séparation de plusieurs milligrammes de glucuronides et la résolution du système semi-préparatif. Dans ces conditions, les deux diastéréoisomères formés à partir du *RS*-kétoprofène apparaissent sous la forme d'un seul pic. Leur séparation nécessite la mise au point d'autres conditions chromatographiques.

1.1.2. Principe de la synthèse chimique

La préparation de 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène par synthèse chimique nécessite plusieurs étapes.

1) *Couplage au DCCI du 2,3,4,6-tétra-O-benzyl-D-glucose et du kétoprofène.*

Cette étape est à l'origine de la production de l'ester 2,3,4,6-tétra-*O*-benzyl-1-*O*-kétoprofényle-D-glucose, en configuration α et β . Le couplage au DCCI a été retenu car il permet d'obtenir, comparativement à d'autres méthodes de couplage (couplage au chlorure d'acide), un taux d'anomère β plus important (supérieur à 50%) (Keglevic *et al.*, 1968).

2) *Purification de l'anomère β par CLHP préparative en phase normale.*

C'est une étape particulièrement délicate. En effet, les propriétés chromatographiques des anomères α et β de l'ester synthétisé sont proches. De plus, la difficulté est augmentée par la présence des deux diastéréoisomères *R* et *S* de l'ester qui possèdent également des propriétés chromatographiques équivalentes. Ainsi, les conditions chromatographiques, et plus particulièrement le choix de l'éluant, ont été précisément adaptés pour séparer des deux anomères α et β , et ont conduit également à la séparation des deux diastéréoisomères *R* et *S*.

3) *Débenzylation du 2,3,4,6-tétra-O-benzyl-1-O-kétoprofényle-D-glucuronide par hydrogénation.*

Cette étape présente l'avantage de ne pas nécessiter de purification ultérieure. En effet, le seul produit secondaire formé est un solvant organique, le toluène, très facilement éliminé par évaporation du milieu réactionnel.

4) *Oxydation en C6 au TEMPO.*

Cette réaction génère un certain nombre de composés et nécessite une ultime étape de purification du produit principal de la réaction, en l'occurrence le 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène. Ce produit, hydrophile, est séparé par CLHP en phase inverse selon la méthode utilisée pour isoler le glucuronide de kétoprofène produit par synthèse enzymatique.

La mise au point de chaque étape de la synthèse chimique ne nous a pas permis de la réaliser dans des conditions optimales et de calculer le rendement exact de production du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène. Toutefois, son ordre de grandeur est d'environ 50%. Il reste à reproduire cette synthèse dans son intégralité et dans des conditions optimales pour permettre le calcul de ce rendement.

1.1.3. Identification et analyse structurale du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide synthétisé

Les produits obtenus par synthèse enzymatique ou chimique ont été séparés par CLHP analytique en phase inverse.

Les profils chromatographiques des milieux réactionnels des deux méthodes de synthèse sont présentés sur les figures 23A et 23B. Le profil chromatographique des produits de la synthèse enzymatique (figure 23A) comprend quatre pics A1, A2, A3 et A4, élués respectivement à 2,3, 5,9, 6,1 et 14,3 minutes. Ces pics ont été précédemment identifiés comme étant l'UDPGA, les deux diastéréoisomères *S* et *R* de glucuronide de kétoprofène et le kétoprofène, respectivement (Chakir *et al.*, 1994). Le profil chromatographique résultant de la synthèse chimique est plus complexe (figure 23B). Il fait apparaître de nombreux pics, dont trois (pics B1, B2 et B3, élués respectivement à 5,8, 6,1 et 6,7 minutes) qui présentent un temps de rétention similaire à ceux des diastéréoisomères de glucuronide de kétoprofène de la figure 23A (pics A2 et A3, élués respectivement à 5,9 et 6,1 minutes). Afin de déterminer lequel des trois pics B1, B2 et B3 est effectivement le glucuronide de kétoprofène, les spectres UV de chacun de ces pics ont été déterminés et comparés avec les spectres des diastéréoisomères de glucuronide de kétoprofène obtenu par synthèse enzymatique. La comparaison des spectres UV de B1, B2 et B3 avec les spectres UV des deux diastéréoisomères *R* et *S* de 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène indique que seul B3 présente le même spectre UV que les diastéréoisomères et que le kétoprofène (résultats non montrés), ce qui suggère que B3 est le glucuronide de kétoprofène produit.

La purification par CLHP semi-préparative permet de séparer le glucuronide de kétoprofène des autres produits de la réaction, qu'elle soit enzymatique ou chimique, mais les conditions chromatographiques utilisées ne sont pas adaptées pour séparer les diastéréoisomères *R* et *S* de glucuronide de kétoprofène, ni les anomères α et β ou les isomères de position 2-, 3- et 4-*O*-acyl-D-glucuronides. Le pic de glucuronide de kétoprofène B3 élué à 6,7 minutes peut en fait inclure différents isomères et pas uniquement le 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide.

La RMN ^1H a donc été utilisée pour caractériser de manière précise la structure du glucuronide de kétoprofène synthétisé par voies enzymatique et chimique. Cette technique d'analyse présente l'avantage de pouvoir distinguer les anomères α et β , les isomères de position 1-, 2-, 3- ou 4-*O*-acyl-D-glucuronides de kétoprofène, et également d'évaluer la pureté du produit synthétisé.

Les spectres RMN ^1H du glucuronide de kétoprofène produit par synthèse enzymatique ou par synthèse chimique, puis purifié par CLHP semi-préparative en phase inverse, sont représentés respectivement sur la figure 24A et 24B. L'analyse de ces spectres montre, dans les deux cas, la présence de signaux entre 7,0 et 7,8 ppm correspondant aux protons aromatiques du kétoprofène. Les signaux à 5,5 ppm (synthèse enzymatique, deux doublets, figure 24A) et 5,4 ppm (synthèse chimique, un doublet, figure 24B) correspondent au proton anomérique. Les valeurs de constantes de couplage situées entre 2 et 4 Hz sont caractéristiques d'anomères α alors que les valeurs des constantes de couplage comprises entre 7 et 10 Hz sont compatibles avec les anomères β . Or, les

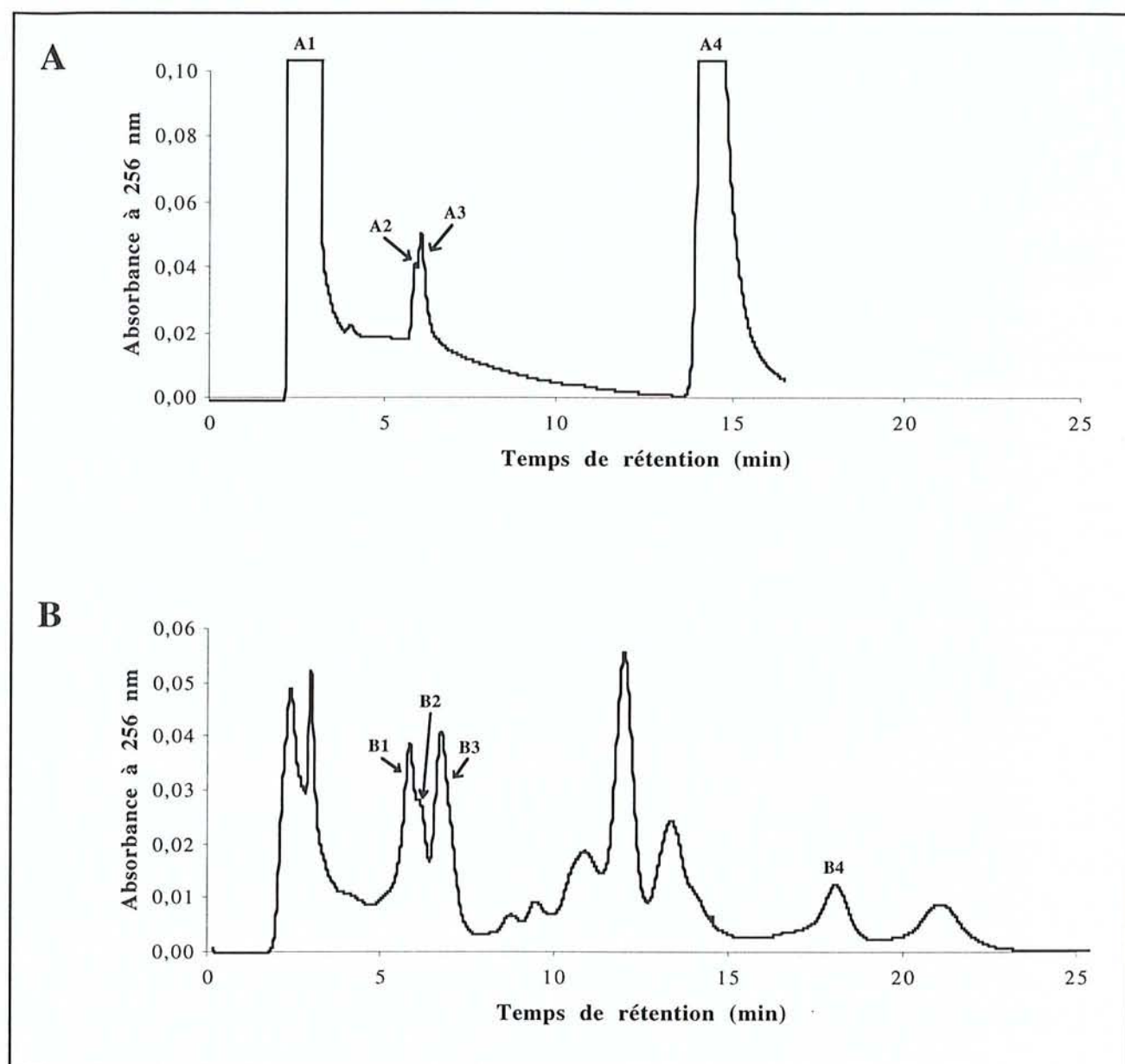


Figure 23. Comparaison des profils chromatographiques des milieux réactionnels de la synthèse enzymatique (A) et de la synthèse chimique (B) de glucuronide de kétoprofène.

A1, UDPGA ; A2, 1-*O*-acyl-β-D-glucuronide de *S*-kétoprofène ; A3, 1-*O*-acyl-β-D-glucuronide de *R*-kétoprofène ; A4, *RS*-kétoprofène.

B1, produit non identifié ; B2, produit non identifié ; B3, glucuronide de kétoprofène ; B4, *RS*-kétoprofène.

Les synthèses enzymatique et chimique sont décrites au chapitre *Matériel et Méthodes*. Les milieux de synthèses sont analysés sur une colonne Lichrospher RP18, 5μm, 250 x 4 mm (Merck). Les conditions chromatographiques sont les suivantes : la phase mobile est composée d'un mélange acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique (35:65:0,04 v/v), le débit de la phase mobile est de 0,8 mL/min et la détection est réalisée à 256 nm.

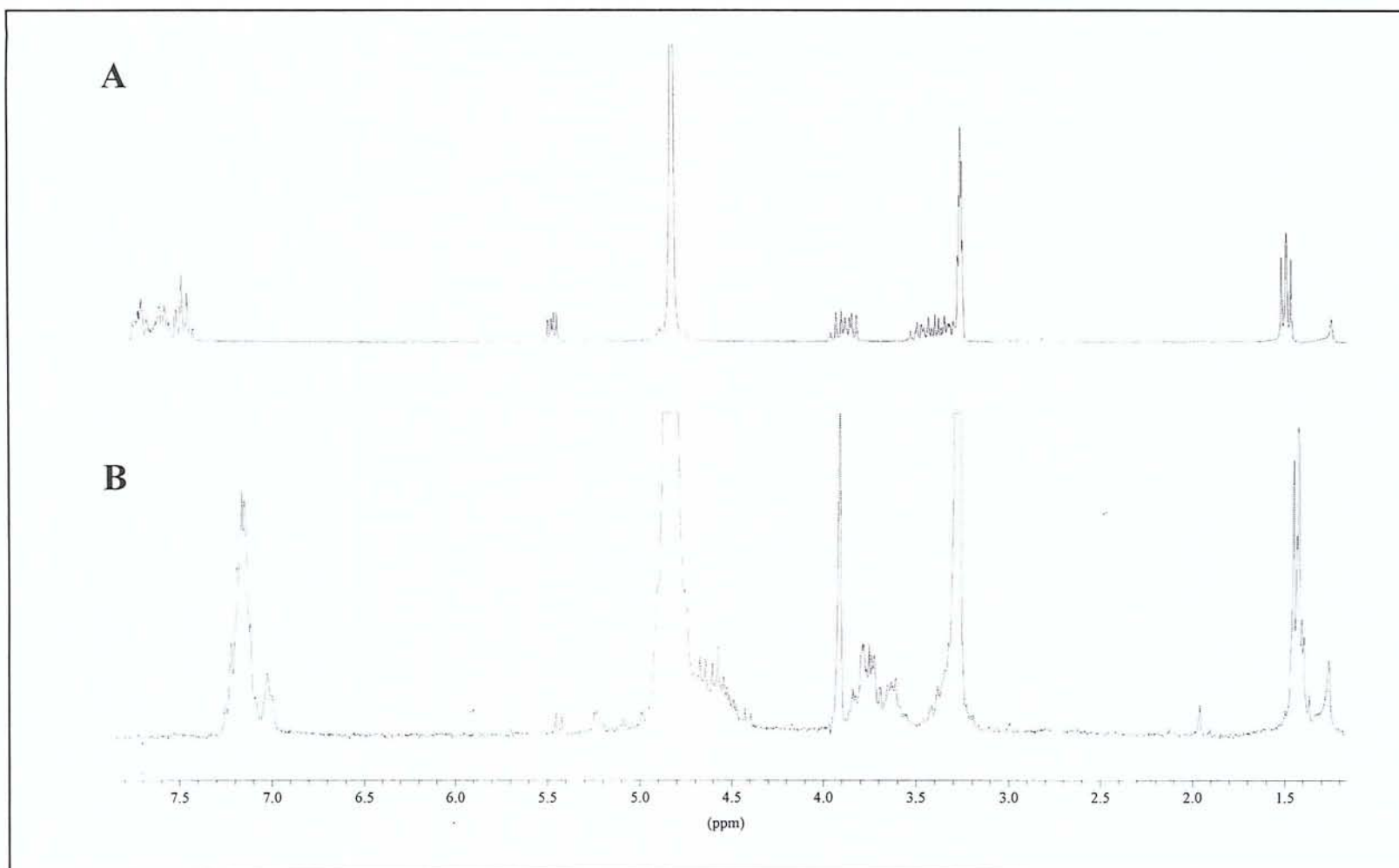


Figure 24. Comparaison des spectres ^1H -RMN de glucuronide de kétoprofène synthétisé par voies enzymatique et chimique.

Le glucuronide de kétoprofène, obtenu par synthèse enzymatique (A) ou par synthèse chimique (B) à partir de *RS*-kétoprofène, est mis en solution dans le méthanol deutérié.

constantes de couplage caractérisant les doublets à 5,5 et 5,4 ppm sont aux environs de 8 Hz, et sont donc en accord avec une configuration β de la liaison entre l'acide *D*-glucuronique et le kétoprofène (Weil *et al.*, 1990).

Dans le cas de la synthèse enzymatique, la présence des deux doublets qui se chevauchent à 1,51 et 1,48 ppm correspond aux protons du groupement méthyle porté par le carbone asymétrique, et la présence des deux doublets à 5,48 et 5,47 ppm correspond au proton anomérique. Le dédoublement des signaux d'intensité égale correspondant aux protons du groupement méthyle et au proton anomérique, indique la présence d'un mélange équimoléculaire de diastéréoisomères *R* et *S* du glucuronide de kétoprofène. Dans le cas de la synthèse chimique, les signaux à 1,42 et 5,42 ppm, dus aux protons du groupement méthyle et au proton anomérique, respectivement, sont sous forme d'un seul doublet, indiquant la présence d'un seul des deux diastéréoisomères. En effet, la première étape de purification par CLHP préparative en phase normale a conduit à séparer les deux diastéréoisomères *R* et *S* de kétoprofène en même temps que les anomères α et β , ce qui explique la présence finale d'un seul des diastéréoisomères (résultats non montrés). Ce résultat montre également que les étapes de la synthèse chimique n'induisent pas d'inversion chirale.

En outre, d'autres doublets, compris entre 4,3 et 4,8 ppm, sont présents sur le spectre RMN ^1H du glucuronide de kétoprofène synthétisé chimiquement. Ces doublets fortement déblindés pourraient correspondre aux protons d'isomères de position 2-, 3- ou 4-*O*-acyl- β -D-glucuronides. Ce dernier résultat suggère que la synthèse chimique de glucuronide de kétoprofène génère non seulement du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide mais également des isomères de position. Ces acylmigrés pourraient être produits directement ou par dégradation du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide au cours des étapes de la synthèse.

1.1.4. Avantages et inconvénients des méthodes de synthèse

D'un point de vue général, la synthèse enzymatique tire avantage de la spécificité de la réaction de glucuronoconjugaison en milieu biologique qui permet de ne produire que des 1- β -D-glucuronides. La spécificité de substrat par une isoforme déterminée, la variation inter-espèces de la glucuronoconjugaison ou encore l'énantiosélectivité de la réaction sont des paramètres qui conditionnent le rendement de la synthèse enzymatique de 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide à partir d'un acide carboxylique donné.

La glucuronoconjugaison du kétoprofène est en effet différente d'une espèce à l'autre. L'activité catalytique des UGT vis-à-vis du kétoprofène est plus importante chez le chien que chez l'homme et le rat par exemple. Les isoformes principalement impliquées dans la glucuronoconjugaison des AINS sont les UGT de la famille 2 (UGT2B1 chez le rat), dont l'expression est induite par le phénobarbital (Mackenzie *et al.*, 1989). Ainsi, pour la synthèse enzymatique du glucuronide de kétoprofène, nous avons retenu l'immobilisation en billes d'alginate de microsomes hépatiques de rat traités au phénobarbital, les microsomes de chien n'étant pas facilement disponibles en laboratoire.

Par ailleurs, l'énantiosélectivité de la réaction enzymatique peut favoriser la formation, à partir du mélange racémique de l'aglycone, d'un diastéréoisomère par rapport à l'autre. Le kétoprofène est

administré chez l'homme, comme la plupart des AINS, sous forme de mélange racémique équimoléculaire. La glucuroconjugaison du kétoprofène n'est pas énantiosélective chez l'homme ni le rat (Chakir *et al.*, 1994). Ainsi, la synthèse enzymatique à partir de *RS*-kétoprofène, au moyen de microsomes de rat immobilisés dans des billes d'alginate, a conduit à la production des deux diastéréoisomères avec un rapport énantiomérique *R/S* voisin de 1 (Greige-Georges, 1999).

L'utilisation d'UGT immobilisées dans des billes d'alginate permet de maintenir les enzymes dans leur environnement membranaire. Ce système présente les avantages d'activer les enzymes (augmentation de l'activité catalytique) et de les stabiliser, assurant ainsi la réutilisation du bioréacteur jusqu'à quatre fois. De plus, le milieu réactionnel peu complexe facilite la purification des glucuronides formés en présence des seuls substrat et cosubstrat de la réaction. Au contraire, l'extraction de glucuronides à partir des milieux biologiques (urine ou bile), qui représente également un moyen de disposer de glucuronides en relativement grandes quantités, se heurte à des difficultés de purification du métabolite à partir des milieux biologiques riches et complexes, ainsi qu'à des limitations d'ordre réglementaire en nécessitant l'administration du médicament à l'animal. Cependant, la synthèse de glucuronides en bioréacteur est limitée par l'activité catalytique intrinsèque de l'enzyme vis-à-vis d'un médicament donné et il est alors impossible d'augmenter significativement les rendements de production. Cette méthode est, d'autre part, relativement coûteuse. Elle nécessite la préparation de microsomes de rats induits au phénobarbital et l'utilisation de quantités importantes d'UDPGA qui ne peut être recyclé après la synthèse.

Cette méthode a été exploitée, au cours de précédents travaux, pour synthétiser *in vitro* des glucuronides de médicaments (glucuronide d'AZT, Haumont *et al.*, 1990 ; glucuronide de naftazone, Herber *et al.*, 1995) dans le but de fournir des standards pour l'identification des métabolites formés *in vivo* et d'étudier leurs propriétés pharmacologiques et toxicologiques. L'utilisation de cette méthode ne nous a cependant pas permis, au laboratoire, de produire les glucuronides de bilirubine.

La synthèse chimique est spécifique de la chimie des sucres et des glucuronides. Cette méthode permet de produire des quantités de glucuronides de l'ordre de plusieurs grammes et ne nécessite aucun réactif particulièrement coûteux. Elle reste cependant contre-indiquée en cas d'instabilité chimique du médicament et/ou du glucuronide au cours de la procédure de synthèse. Son inconvénient majeur est de conduire à la formation d'un mélange anomérique (anomères α et β) et isomérique (isomères de position) de glucuronides, à partir duquel il convient d'isoler et de purifier l'isomère 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide. Pour pallier cette difficulté, nous avons envisagé une nouvelle stratégie de synthèse chimique, dont les différentes étapes sont brièvement décrites sur la figure 25. Le principe de la synthèse, réalisée à partir du méthyl-D-glucose, est basé sur la protection des groupements hydroxyles et de la fonction carboxyle réactive. Cette synthèse comprend un plus grand nombre d'étapes (8 étapes) mais présente deux avantages. Le premier est la limitation à une seule étape de purification au lieu de deux lors de la synthèse précédente. Le deuxième est la possibilité de généraliser la synthèse à la production de différents acylglucuronides. En effet, le couplage du sucre à un acide carboxylique déterminé est la dernière étape de la synthèse. Les premières étapes, communes à la production de tout acylglucuronide, peuvent donc être réalisées en grande quantité.

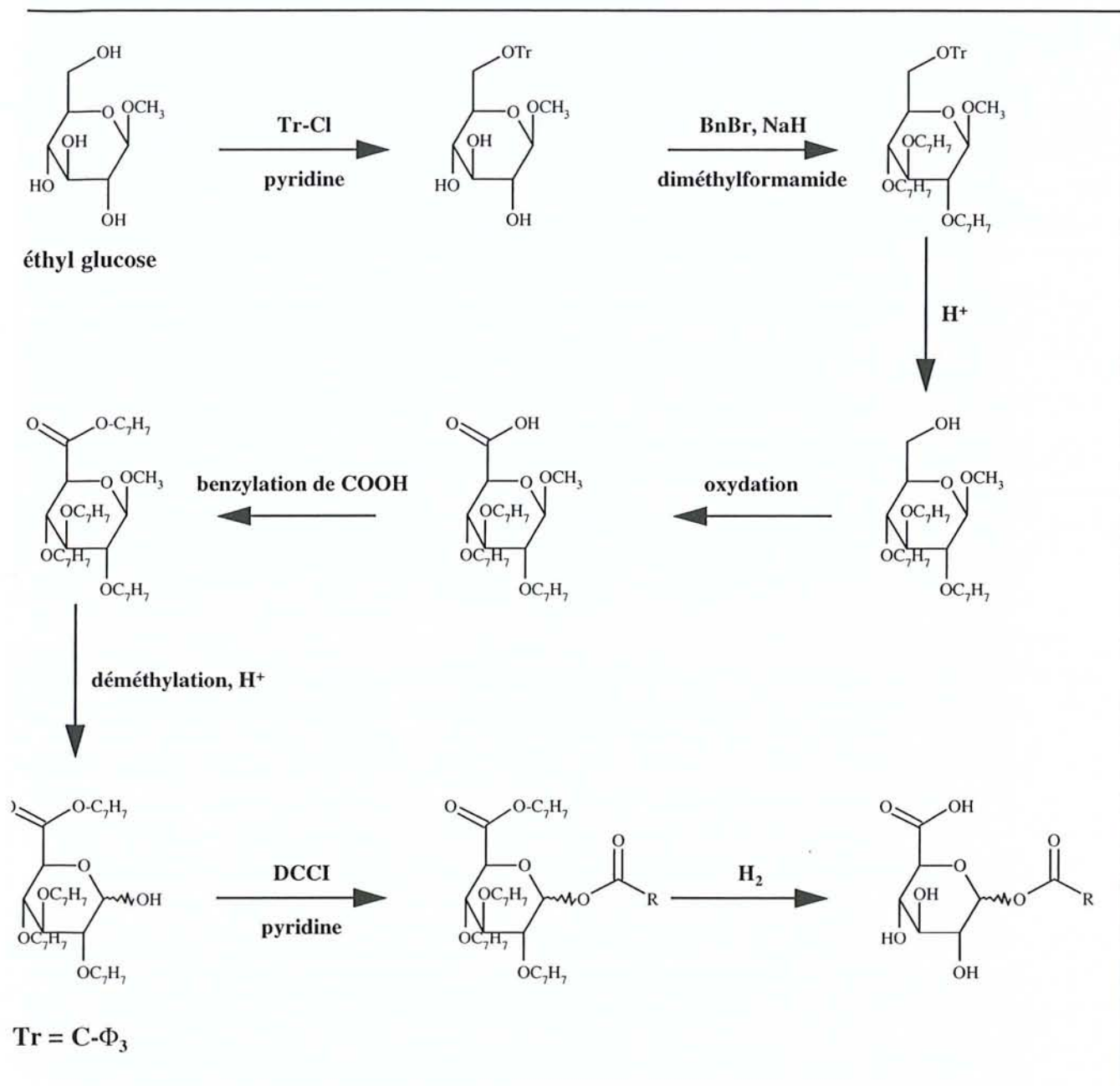


Figure 25. Stratégie de synthèse chimique de 1-O-acyl-β-D-glucuronide à partir d'acide carboxylique.

La synthèse enzymatique a permis la production, à partir de *RS*-kétoprofène, d'un mélange des deux diastéréoisomères *R* et *S* de 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide, avec une pureté supérieure à 98%, et avec un rendement compris entre 10 et 15%. La synthèse chimique, quant à elle, a permis de produire, à partir de *RS*-kétoprofène, un mélange des deux diastéréoisomères *R* et *S* de 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide. Cette méthode de synthèse devrait fournir plusieurs grammes de glucuronide de kétoprofène. L'estimation préalable de la quantité de glucuronide d'acide carboxylique nécessaire à une étude déterminée conditionnera le choix de l'une ou l'autre méthode de synthèse de ce glucuronide. L'utilisation d'une nouvelle synthèse chimique, évoquée précédemment, est une perspective intéressante dans le cadre, par exemple, d'une comparaison de la réactivité d'acylglucuronides formés à partir de plusieurs AINS de la famille des profènes.

1.2. Réactivité de métabolites d'acides carboxyliques exogènes

1.2.1. Interaction de l'acylglucuronide de kétoprofène avec les UGT

Publication 1

Human and rat liver UDP-glucuronosyltransferases are targets of ketoprofen acylglucuronide

Nadège Terrier, Etienne Benoît, Claire Senay, Françoise Lapicque, Anna Radomska-Pandya, Jacques Magdalou and Sylvie Fournel-Gigleux

Molecular Pharmacology **56**: 226-234 (1999)

Dans l'objectif d'identifier les cibles protéiques intracellulaires de l'acylglucuronide de kétoprofène, nous avons analysé en particulier la réactivité de ce métabolite vis-à-vis de systèmes enzymatiques microsomaux. Nous avons testé l'hypothèse d'une réactivité du glucuronide de kétoprofène sur les protéines à l'origine de sa biosynthèse, en l'occurrence les UGT, et nous avons évalué les conséquences potentielles sur la fonction catalytique de ces enzymes.

En premier lieu, nous montrons que le glucuronide de kétoprofène est un inhibiteur irréversible *in vitro* de la glucuronoconjugaison du 1- et 2-naphtol catalysée par différentes isoformes d'UGT (microsomes hépatiques de rat et humains, fractions membranaires de cellules recombinantes exprimant l'UGT2B1 et l'UGT2B7). Cette inhibition, dépendante de la concentration en acylglucuronide, est corrélée à la quantité d'adduits formés avec les protéines microsomaux. En outre, les glucuronides de kétoprofène synthétisés *in situ* par les cellules V79-UGT2B1 en culture se fixent de manière covalente sur les protéines, à l'origine d'une inhibition d'environ 35% de la glucuronoconjugaison du 2-naphtol.

Ces résultats suggèrent que la fixation covalente du glucuronide de kétoprofène sur les UGT est à l'origine de l'inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison.

Dans un second temps, les expériences de Western blot immunorévélés par des anticorps anti-kétoprofène mettent en évidence l'existence d'une cible protéique intracellulaire majoritaire du glucuronide de kétoprofène, avec une masse moléculaire d'environ 56 kDa, correspondant à celle des UGT. Nous décelons également la présence d'autres protéines microsomaux adduites, avec des masses moléculaires comprises entre 20 et 100 kDa. Ces cibles protéiques ne sont pas identifiées. Les expériences d'immunofluorescence, réalisées avec des cellules V79-UGT2B1 mises en présence de kétoprofène montrent une localisation des adduits, révélés par les anticorps anti-kétoprofène, dans le RE des cellules, correspondant à celle des UGT. La purification d'UGT adduites sur une colonne diéthylaminoéthyl-Sephacel, à partir de microsomes hépatiques de rat préalablement incubés avec du glucuronide de kétoprofène, indique sans ambiguïté que les UGT sont des cibles protéiques intracellulaires du glucuronide de kétoprofène. Enfin, les expériences de marquage de photo-affinité montrent que le glucuronide de kétoprofène entre en compétition avec la sonde photo-[β - 32 P]5N₃UDPGA, analogue de l'UDPGA, pour se fixer sur l'UGT2B7. La fixation covalente du métabolite dans le site actif de l'UDPGA, site conservé au sein des UGT, serait à l'origine de l'inhibition des différentes isoformes d'UGT.

L'investigation des mécanismes impliqués dans la formation des adduits par le glucuronide de kétoprofène, ainsi que la comparaison de la réactivité de ce métabolite avec celle d'autres acylglucuronides seront discutées ultérieurement.

Human and Rat Liver UDP-Glucuronosyltransferases Are Targets of Ketoprofen Acylglucuronide

ADÈGE TERRIER, ETIENNE BENOIT, CLAIRE SENAY, FRANÇOISE LAPICQUE, ANNA RADOMINSKA-PANDYA, ACQUES MAGDALOU, and SYLVIE FOURNEL-GIGLEUX

Unité Mixte de Recherche 7561 Centre National de la Recherche Scientifique-Université Henri Poincaré Nancy 1, Vandœuvre-lès-Nancy, France (N.T., C.S., F.L., J.M., S.F.-G.); Unité Associée Institut National de la Recherche Agronomique-Direction Générale Enseignement-Recherche, Toxicologie et Métabolisme Comparés des Xénobiotiques, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France (E.B.); and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas (A.R.-P.)

Received February 18, 1999; accepted April 20, 1999

This paper is available online at <http://www.molpharm.org>

ABSTRACT

Acylglucuronides formed from carboxylic acids by UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) are electrophilic metabolites able to covalently bind proteins. In this study, we demonstrate the activity of the acylglucuronide from the nonsteroidal anti-inflammatory drug, ketoprofen, toward human and rat liver UGTs. Ketoprofen acylglucuronide irreversibly inhibited the glucuronidation of 1-naphthol and 2-naphthol catalyzed by human liver microsomes or by the recombinant rat liver isoform, UGT2B1, which is the main isoform involved in the glucuronidation of the drug. A decrease of about 35% in the glucuronidation of 2-naphthol was observed when ketoprofen acylglucuronide was produced in situ in cultured V79 cells expressing UGT2B1. Inhibition was always associated with the formation of microsomal protein-ketoprofen adducts. The presence of these covalent adducts within the endoplasmic reticulum of cells expressing UGT2B1 was demonstrated following addition

of ketoprofen to culture medium by immunofluorescence microscopy with antiketoprofen antibodies. Immunoblots of liver microsomes incubated with ketoprofen acylglucuronide and probed with antiketoprofen antibodies revealed the presence of several protein adducts; among those was a major immunoreactive protein at 56 kDa, in the range of the apparent molecular mass of UGTs. The adduct formation partially prevented the photoincorporation of the UDP-glucuronic acid (UDP-GlcUA) analog, [β - 32 P]5N₃UDP-GlcUA, on the UGTs, suggesting that ketoprofen glucuronide covalently reacted with the UDP-GlcUA binding domain. Finally, UGT purification from rat liver microsomes incubated with ketoprofen glucuronide led to the isolation of UGT adducts recognized by both anti-UGT and antiketoprofen antibodies, providing strong evidence that UGTs are targets of this metabolite.

Glucuronidation is the major metabolic pathway for carboxylic acid containing drugs, such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) of the series of 2-phenylpropionic acid (profens), as well as diuretics and hypolipidemic agents. The reaction leads to the formation of acylglucuronides that are excreted in bile or urine. Unlike etherglucuronides formed from hydroxylated molecules, acylglucuronides are electrophilic species known to be intrinsically reactive both in vitro and in vivo (Spahn-Langguth and Benet, 1992). They undergo spontaneous hydrolysis to the parent drug as well as intramolecular rearrangement leading to β -glucuronidase-resistant 2-, 3-, and 4-*O*-acyl isomers. In addition, acylglucuronides bind covalently to endogenous macromolecules. Such irreversible binding with plasma pro-

teins has been reported by us and others for the acylglucuronides of several drugs including ketoprofen (Presle et al., 1996), tolmetin (Hyneck et al., 1988), zomepirac (Smith et al., 1990), ibuprofen and ibufenac (Castillo and Smith, 1995), and benoxaprofen (Spahn et al., 1990). It also has been documented that tissue proteins may be targets for acylation by metabolites of diflunisal (King and Dickinson, 1993), diclofenac (Kretz-Rommel and Boelsterli, 1994; Hargus et al., 1994), and tolmetin (Ojingwa et al., 1994). It has been postulated that proteins modified by the formation of adducts with drug acylglucuronides may cause immunological side effects and hepatotoxicity observed for these drugs (Olson et al., 1992). These effects have led to the withdrawal from the market of several NSAIDs, such as tolmetin, zomepirac, and benoxaprofen.

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) are a multigenic family of membrane-bound enzymes that are responsible for the glucuronidation of various drugs and endogenous com-

This work was supported by the Région Lorraine, the Ministère des Affaires Étrangères, and the Association de Recherche sur la Polyarthrite. It is in partial fulfillment of the doctoral thesis of N.T.

ABBREVIATIONS: NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; CHAPS, 3-[(3-chloroamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate; FITC, fluorescein isothiocyanate; PB, phenobarbital; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; UDP-GlcUA, UDP-glucuronic acid; UGT, UDP-glucuronosyltransferase.

ands containing hydroxyl, carboxyl, amino, or sulfhydryl groups (Mackenzie et al., 1997). From the 50 UGT cDNA that have been isolated and characterized in rat and human until now, only two isoforms (UGT2B1 and UGT2B7) have been identified to glucuronidate NSAIDs chemically related to phenylpropionic acid to an appreciable extent. The human UGT2B7 isoform, which has been expressed in HK293 cells, also glucuronidates catechol estrogens and androgens (Coffman et al., 1998). We recently stably expressed the cDNA coding UGT2B1 in V79 fibroblasts (Pritchard et al., 1994). Analysis of the substrate specificity of this isoform revealed that carboxylic substances such as NSAIDs (ketoprofen, ibuprofen, and carprofen), hypolipidemic agents (clofibrilic acid), and short-chain fatty acids were the major substrates of this enzyme, whereas hydroxylated substances, such as 2-naphthol, were also glucuronidated but at a lower rate. Because of its potency in catalyzing the formation of acylglucuronides, UGT2B1 is a model enzyme for studying the formation and activity of the acylglucuronides.

Ketoprofen, a widely used NSAID, is mainly glucuronidated in the liver as an acylglucuronide (Upton et al., 1980). Taking into account the reactivity of ketoprofen acylglucuronide and its main source of formation in the liver by the UGTs, it is likely that it could also bind to intracellular proteins, including UGTs themselves. In the present study, we investigated the reactivity of the glucuronide of racemic ketoprofen toward microsomal and recombinant UGT isoforms, particularly UGT2B1, responsible for the acylglucuronide formation. The results clearly show, for the first time, that ketoprofen glucuronide covalently binds to UGTs, which are irreversibly inactivated as a result of adduct formation.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Ketoprofen [*R,S*-2-(3-benzoylphenyl)propionic acid], 1-naphthol, 2-naphthol, 1-naphthyl- β -D-glucuronide, D-saccharic acid 1,4-lactone, sodium cyanide, dimethyl sulfoxide, 3-[(3-chloroamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), paraformaldehyde, gelatin from bovine skin, and rabbit anti-goat and goat anti-rabbit alkaline phosphatase-conjugated IgG were obtained from Sigma (L'Isle d'Abeau, St. Quentin Fallavier, France). Saponin was provided by Aldrich (L'Isle d'Abeau, St. Quentin Fallavier, France). UDP-glucuronic acid (UDP-GlcUA) (sodium salt) was obtained from Boehringer (Mannheim, Germany). Dulbecco's modified Eagle's medium was obtained from Gibco-BRL (Eragny, France). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated donkey anti-goat and goat anti-rabbit IgG were purchased from Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). Affi-Gel Protein A mitogen-activated protein II was purchased from Bio-Rad (Ivry-sur-Seine, France). Diethylaminoethyl (DEAE)-Sephacel (DEAE-cellulose anion exchanger) was purchased from Sigma. Blue Sepharose CL-6B (Cibacron Blue 36-A covalently attached to Sepharose CL-6B by the triazine coupling method) was purchased from Pharmacia Biotech (St. Quentin-Yvelines, France). The UGT inhibitor, 7,7,7-triphenylheptanoic acid, was synthesized according to Fournel-Gigleux et al. (1989). The radiolabeled photoaffinity probe, [β - 32 P]5N $_3$ UDP-GlcUA (specific activity 2–5 mCi/mmol), was synthesized as previously described (Drake et al., 1992).

Enzyme Fractions

Hepatic Microsomes. Human hepatic microsomes were prepared from transplantable livers according to the method of Dragacci et al. (1987). Male Wistar rats weighing 180 to 200 g were kept in an

environmentally controlled room (24°C, 12-h light cycle, constant humidity). For induction purpose, rats were given a single i.p. injection of phenobarbital (PB, sodium salt; Fluka, Buchs, Switzerland) at the dose of 100 mg/kg b.wt. (w/v) in NaCl 0.9%. PB was then added to the drinking water (1 g/liter) for 5 days. Liver microsomes from PB-treated rats were prepared by ultracentrifugation according to the method of Hogeboom (1955).

Membrane Fraction of Recombinant Cells Expressing UGT2B1 or UGT2B7. The establishment of the recombinant V79 cell lines (Chinese hamster lung fibroblasts) stably expressing the rat liver UGT2B1 and of the recombinant HK293 cell line stably expressing the human liver UGT2B7 has been described previously (Pritchard et al., 1994; Coffman et al., 1998).

Enriched membrane fractions of all recombinant cells were prepared from cell homogenates by differential ultracentrifugations, as previously described (Battaglia et al., 1994). Briefly, the cells were homogenized in 0.25 M sucrose, 5 mM HEPES (pH 7.4), and subjected to three 5-s sonications (Vibra Cell; Bioblock Scientific, Strasbourg, France). The homogenate was centrifuged at 10,000g for 10 min, and the resultant supernatant was centrifuged at 100,000g for 60 min. The final pellet, representing the enriched membrane fraction, was suspended in the same buffer and frozen at -80°C. The protein concentration was measured according to Lowry et al. (1951), with BSA (fraction V, Sigma) as standard.

Synthesis and Analysis of Ketoprofen Glucuronide

Ketoprofen glucuronide was prepared from PB-treated rat liver microsomes immobilized on alginate beads, as previously described (Haumont et al., 1991). Semipreparative HPLC was used to separate large amounts of biosynthesized glucuronide from UDP-GlcUA and ketoprofen. The HPLC apparatus consisted of a pump (L-6000 Hitachi; Merck, Darmstadt, Germany) equipped with an injector (Rheodyne valve with a 100- μ l sample loop; Rheodyne Inc., Cotati, CA). A 7- μ m Lichrosorb RP18 column (250 $\times$ 10 mm; Merck, Darmstadt, Germany) was employed. The separated products were monitored by a UV detector (480 Waters Lambda Max; Milford, MA) coupled to a computing integrator (D-2000, Merck). The mobile phase consisted of acetonitrile/water/trifluoroacetic acid at a ratio 40:60:0.04 (v/v, pH 2.2) used at a flow rate of 2.5 ml/min. Detection of the glucuronide was performed at 256 nm. The eluted glucuronide was collected and dried under nitrogen. The mass and 1 H-NMR spectra of ketoprofen glucuronide were in accordance with the proposed structure. For analytical assays, HPLC separation of ketoprofen and ketoprofen glucuronide was performed on a 5- μ m Lichrospher RP18 column (125 $\times$ 4 mm, Merck) with a mobile phase consisting of acetonitrile/water/trifluoroacetic acid at 35:65:0.04 (v/v, pH 2.2), at a flow rate of 0.8 ml/min. Quantitation of ketoprofen glucuronide was obtained from calibration curves drawn with ketoprofen, because the molar extinction coefficients at 256 nm of ketoprofen and ketoprofen glucuronide dissolved in the mobile phase are similar.

UGT Activity Measurement

1-Naphthol and 2-naphthol were used as reporter substrates for measurement of the glucuronidation activity supported by human hepatic microsomes and by membrane fractions of cells expressing UGT2B1.

The reaction mixture contained, in a total volume of 100 μ l, human hepatic microsomes (20 μ g protein) or membrane fractions of UGT2B1 (50 μ g protein) incubated in 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 10 mM MgCl $_2$ with 1 mM 1-naphthol or 2-naphthol dissolved in dimethyl sulfoxide at 37°C for 15 to 20 min. The reaction was initiated by the addition of 2 mM UDP-GlcUA. The reaction was stopped with 10 μ l 6 N HCl and the sample was centrifuged for 10 min at 5,000g.

HPLC quantitation of naphthyl- β -D-glucuronides was carried out on a 5- μ m Lichrospher RP18 column (125 $\times$ 4 mm, Merck) with a mobile phase consisting of acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (35:

0.04, v/v, pH 2.2). 1-Naphthyl- β -D-glucuronide was used as a standard. The flow rate was 0.5 ml/min and detection of glucuronides performed at 229 nm. Specific activities of enzymes are expressed as nmol/min $\cdot$ mg protein. Where applicable, means $\pm$ S.D. reported.

In Vitro Irreversible Binding of Ketoprofen Glucuronide to Proteins

For the analysis of irreversible inhibition, various concentrations of ketoprofen glucuronide (0–5 mM) were incubated with human hepatic microsomes or with membrane fractions of cells expressing UGT2B1 for various time periods (5–30 min) at 25°C in 400 μ l of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, containing 5 mM D-saccharic acid 1,4-lactone, an inhibitor of β -glucuronidase. We found that under these conditions, no significant hydrolysis of ketoprofen glucuronide to the parent drug occurred during the experiment. After centrifugation at 100,000g for 30 min, the protein pellet was washed two times with 200 μ l 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂ to remove unbound ketoprofen glucuronide and then resuspended in 350 μ l of the same buffer. We checked that washings reduced ketoprofen glucuronide levels to noninhibitory concentrations in the assays. Glucuronidation activity toward 1-naphthol or 2-naphthol was assayed as described above. A control experiment in which ketoprofen glucuronide was omitted was performed simultaneously and represented 100% enzyme activity.

To evaluate the amount of protein adducts, 30- μ l aliquots of washed proteins were treated with 500 μ l of 2 M NaOH at 65°C for 12 h. After acidification (200 μ l of HCl 6 N) and extraction of the protein digest with ethyl acetate (2 ml), the amount of ketoprofen released was quantitated by HPLC and corresponded to the irreversible bound fraction. The concentration of covalently bound ketoprofen glucuronide was calculated as nanomoles of ketoprofen per milligram of total microsomal proteins present in the aliquot.

Analysis of Protein Adducts by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blot

PB-treated rat liver microsomes were preincubated for 4 h at 25°C with 2.5 mM ketoprofen glucuronide in 100 μ l of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, containing 5 mM D-saccharic acid 1,4-lactone, with 7 mM sodium cyanide. Proteins were precipitated by addition of 20 μ l of trichloroacetic acid 10% (w/v) and were centrifuged at 13,000g for 10 min. The protein pellet was washed with 500 μ l of ethanol/ether 3:1 (v/v) and solubilized in sample loading buffer [25 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 10% (v/v) mercaptoethanol, and 0.1% (w/v) bromophenol blue]. Aliquots were stored at -20°C until they were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis.

SDS-PAGE was performed according to Laemmli (1970), using a 4% (w/v) stacking gel and a 10% (w/v) running gel, with 100 μ g of proteins loaded per well. After electrophoresis, proteins were transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA) by electroblotting. Immunodetection was accomplished using antiketoprofen polyclonal antibody obtained from female New Zealand White rabbits immunized against ketoprofen-thyroglobulin by the method described for the production of anticarprofen antibodies (Maire-Gauthier et al., 1998). The antiketoprofen IgG were purified from rabbit plasma with a Affi-Gel Protein A mitogen-activated protein II column (Bio-Rad) and were dialyzed overnight against a 0.1 M bicarbonate, 0.5 M NaCl buffer (pH 8.3) at 4°C. The antibody was able to detect as little as 4 pmol of ketoprofen. Antiketoprofen antibodies were diluted 1:3000 (v/v) and the secondary goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate were diluted 1:5000 (v/v).

In Situ Irreversible Binding of Ketoprofen Glucuronide to Proteins

UGT2B1-transfected V79 cells were grown to subconfluency in 100-mm diameter Petri dishes as described above. One day before the

experiment, 5 mM glucose (as a precursor of UDP-GlcUA) and 2 mM *n*-butyric acid (sodium salt) were added to the culture medium. Cells were then treated with 0.5% dimethyl sulfoxide (control) or with 1 mM ketoprofen dissolved in dimethyl sulfoxide [0.5% (v/v)] for 24 h at 37°C, in presence or absence of 2 mM 7,7,7-triphenylheptanoic acid dissolved in dimethyl sulfoxide [0.5% (v/v)]. At this point, samples were taken from the extracellular medium, acidified by HCl 6 N, centrifuged at 5000g for 10 min, and ketoprofen glucuronide content was evaluated by HPLC. The remaining culture medium was discarded and the plates were washed three times with the culture medium. Naphthol glucuronidation assays were then carried out in the same culture medium; the reaction was started by adding substrate [1 mM 2-naphthol dissolved in dimethyl sulfoxide, 0.5% (v/v)] to the medium and samples were incubated for 10 h at 37°C. Aliquots were taken from the extracellular medium after 10 h and total glucuronide formation and the amount of irreversible bound ketoprofen glucuronide to the cell proteins were determined as described above.

Immunofluorescence Microscopy

Control and UGT2B1-transfected V79 cells were grown and treated with ketoprofen as described above. The culture medium was discarded and the plates were washed three times with PBS. Cells were fixed with 2% (w/v) paraformaldehyde in PBS for 20 min, permeabilized with 0.2% (w/v) saponin in PBS for 40 min, and saturated with 0.2% (w/v) gelatin in PBS for 30 min. Two primary antibodies were used for immunodetection: anti-rat liver UGT antibody, which has been shown to react with different UGT isoforms (Coughtrie et al., 1988), and antiketoprofen antibody. Cells were incubated for 1 h with primary anti-UGT or antiketoprofen antibodies, at dilutions of 1:1000 (v/v) and 1:500 (v/v), respectively, in PBS containing 0.1% (w/v) saponin and 1.5% (w/v) BSA. Immunoreactive proteins were then visualized with FITC-conjugated donkey anti-goat IgG or goat anti-rabbit IgG at a dilution of 1:100 (v/v) for 30 min in PBS saline containing 0.1% (w/v) saponin and 1.5% (w/v) BSA. Fluorescence microscopy was performed using a Nikon UFX-DX microscope. Kodak Ektachrome 400 film was used for photography.

Purification of UGT Modified by Ketoprofen Adducts

UGT purification was performed according to the method of Coffman et al. (1996). PB-treated rat liver microsomes were incubated for 4 h at 25°C with 5 mM ketoprofen glucuronide in 8 ml of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, containing 5 mM D-saccharic acid 1,4-lactone and 5 mM sodium cyanide. The microsomes containing the protein adducts (10 mg of protein) were solubilized at 4°C for 30 min by addition of CHAPS to a final concentration of 1 mg detergent/mg protein. The pH of the mixture was adjusted to pH 9.1 with Tris. The mixture was centrifuged at 100,000g for 30 min and the supernatant containing the solubilized material was stored at -20°C until the purification was performed.

The solubilized microsomes were loaded onto a DEAE-Sephacel column (Sigma; 5 cm, 1 cm diameter) equilibrated at 4°C with 50 ml of 25 mM Tris-acetate buffer (pH 9.1), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 20% (v/v) glycerol, and 175 μ g/ml azolectin (Sigma). After loading the solubilized proteins, the column was washed with 20 ml of equilibration buffer and eluted with equilibration buffer containing 50 mM KCl until the absorbance (280 nm) was nearly 0. The UGT proteins were then eluted with 100 mM KCl. Fractions of 2.4 ml were collected and aliquots were subjected to Western blot analysis, as described above, with either anti-UGT or antiketoprofen antibodies. Fractions containing immunoreactive protein were dialyzed overnight at 4°C against 25 mM Tris-acetate buffer (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 20% (v/v) glycerol, and 1% (w/v) CHAPS, and then applied to a Blue Sepharose CL-6B column (Pharmacia Biotech; 5 cm, 1 cm diameter) equilibrated with the same buffer. The column was washed with 2 column volumes of equilibrating buffer and was eluted with a 50-ml gradient ranging from 0 to 0.5 M NaCl.

reactions of 2.4 ml were collected and aliquots were subjected to Western blot analysis with either anti-UGT or antiketoprofen antibodies.

Photoaffinity Labeling with [β - 32 P]5N $_3$ UDP-GlcUA

Human and rat liver microsomes and membrane fractions of UGT2B7-transfected HK293 cells were preincubated for 30 min at 5°C with 2.5 and 5 mM ketoprofen glucuronide, respectively, in 100 μ l of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl $_2$, containing 5 mM α -saccharic acid 1,4-lactone. The inactivation was stopped by a 25-fold dilution with ice-cold 1 mM HEPES, pH 7.4, containing 0.25 M sucrose. The diluted microsomal proteins were then centrifuged at 100,000g for 30 min at 4°C. Pellets were resuspended in a minimal volume of 180 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 28 mM MgCl $_2$, and the proteins were photolabeled as follows: microsomal proteins about 50 μ g were incubated with [β - 32 P]5N $_3$ UDP-GlcUA (40 μ M) in 180 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 28 mM MgCl $_2$ for 1 min on ice, followed by an irradiation for 90 s with a handheld shortwave 254 nm UV lamp (UVG-11, Ultraviolet Products, San Gabriel, CA). Proteins were processed for SDS-PAGE and run on a 10% (w/v) gel as previously described (Drake et al., 1992). After electrophoresis, the gels were dried and radiolabeled proteins were visualized by autoradiography for 5 days at -80°C. The percentage of photoincorporation was determined by densitometry using an imaging densitometer (IS-1000 Digital Imaging System, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

Results

Irreversible Inhibition of UGT Activity by Ketoprofen Glucuronide. The covalent binding of ketoprofen glucuronide (0–5 mM) to human hepatic microsomes and to membrane fractions of UGT2B1-transfected V79 cells was evaluated after washings of the modified proteins. Simultaneously, the effect of ketoprofen glucuronide covalent binding on the glucuronidation capacity of the modified proteins was also investigated. The results as shown in Fig. 1, showed that the concentration-dependent inhibition of naphthol glucuronidation in human hepatic microsomes (Fig. 1A) or UGT2B1-V79 membranes (Fig. 1B) was strongly correlated to an increase of the amount of total ketoprofen adducts, suggesting that binding of ketoprofen glucuronide to proteins, including UGTs, led to inactivation of the modified proteins. Washings did not remove all the unbound ketoprofen glucuronide, but the residual concentration (0.6 mM in human hepatic microsomes treated with 4.5 mM ketoprofen glucuronide and 0.05 mM in membrane fractions of UGT2B1-V79 cells treated with 1.5 mM ketoprofen glucuronide) was too low to be responsible for the observed inhibition of the UGT enzymes (results not shown). To further investigate the mechanism of the ketoprofen glucuronide inhibition, we preincubated human hepatic microsomes (Fig. 2A) and UGT2B1-V79 membrane fractions (Fig. 2B) with increasing ketoprofen glucuronide concentrations for different periods of time. Ketoprofen glucuronide caused a time- and concentration-dependent loss of glucuronidation activity toward 1- and 2-naphthol, indicating an irreversible inhibition caused by the acylglucuronide. A large increase in UGT2B1 inhibition was observed when acylglucuronide concentration changed from 0.91 to 1.71 mM (Fig. 1B). The analysis of the plots revealed the existence of a mixed-type irreversible inhibition.

Characterization and Identification of Ketoprofen-Protein Adducts. The results presented above suggested that the inhibition of the glucuronidation reaction occurred

via covalent binding. To further identify the protein targets of ketoprofen glucuronide, several approaches were used: 1) the microsomal proteins were analyzed by Western blot using antiketoprofen antibodies; 2) the UGT adducts were purified and analyzed by Western blot; and 3) a photoaffinity probe analog of UDP-GlcUA known to bind covalently to the cosubstrate binding site (Drake et al., 1992) was used in an attempt to determine the domain on the UGT protein with which the ketoprofen glucuronide interacts.

PB-treated rat liver microsomes were incubated for 4 h with 2.5 mM ketoprofen glucuronide. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using antiketoprofen antibodies. When PB-treated rat liver microsomes were not treated with ketoprofen acylglucuronide, Western blot anal-

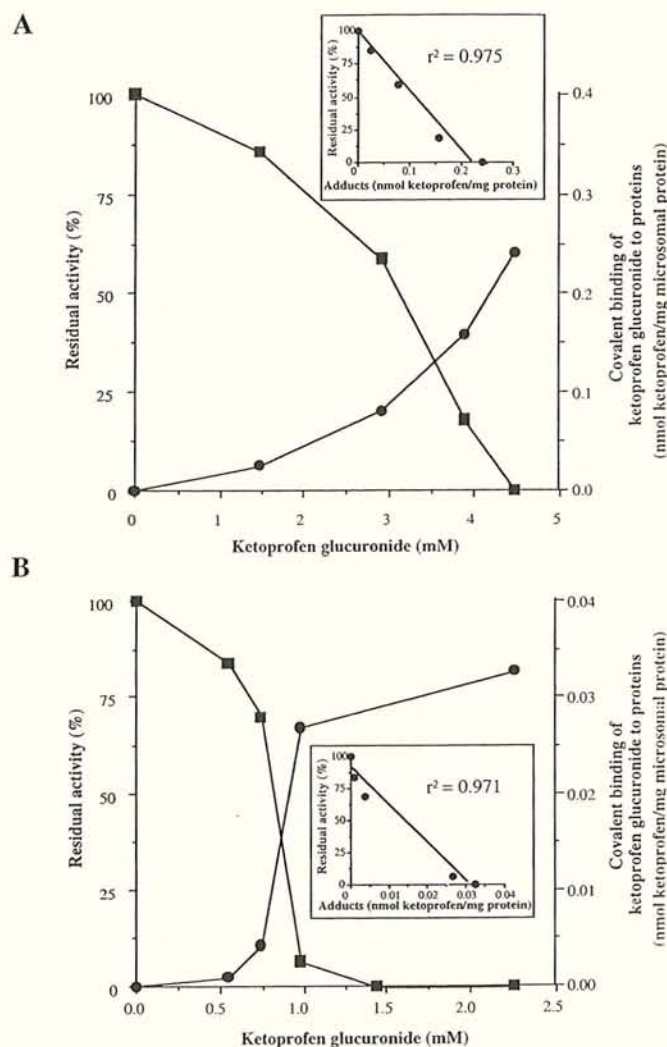
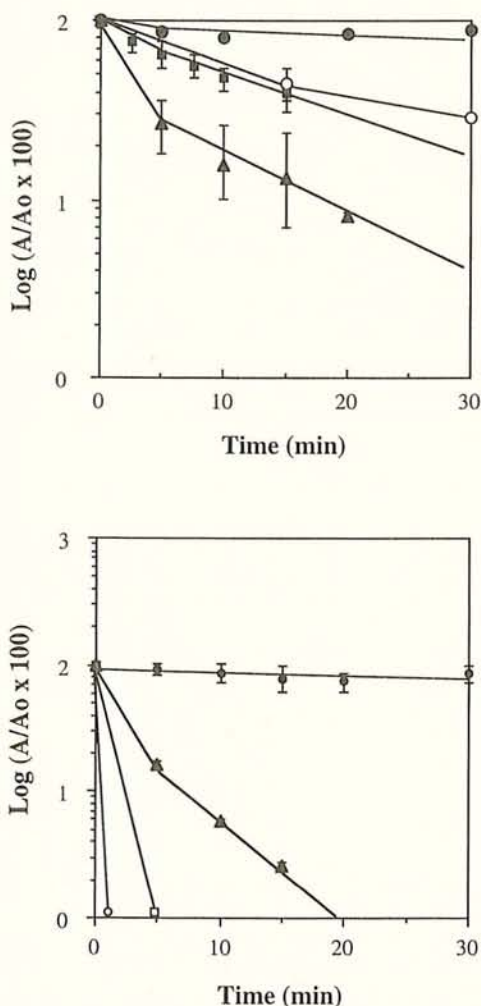


Fig. 1. Relationship between inhibition of 1- and 2-naphthol glucuronidation and covalent binding of ketoprofen glucuronide to proteins. A, inhibition was carried out with human hepatic microsomes in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl $_2$ at 25°C, using various concentrations of ketoprofen glucuronide. Glucuronidation reaction was evaluated using 1-naphthol as substrate. B, inhibition was carried out with membrane fractions of UGT2B1-transfected V79 cells in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl $_2$ at 25°C, using various concentrations of ketoprofen glucuronide. Glucuronidation reaction was evaluated using 2-naphthol as substrate. Inhibitions were quenched at 3 min. Residual activities (■) and amount of irreversibly bound glucuronide (●) were determined as described in *Materials and Methods*. Insets show the correlation between enzyme inactivation and total adduct formation.

antiketoprofen antibodies clearly showed no signals (Fig. 3, lane 1). In contrast, several immunoreactive bands were revealed by antiketoprofen antibodies in PB-treated rat liver microsomes were incubated with ketoprofen glucuronide. Moreover, the presence of a major immunoreactive band was demonstrated (Fig. 3, lane 2). The molecular mass of this polypeptide was about 56 kDa, which was in the range of the molecular weight of UGTs (Schuster et al., 1988). The effect of ketoprofen glucuronide on the intensity of the immunoreactive signals was studied by exposing PB-treated rat liver microsomes to increasing concentrations of ketoprofen glucuronide (0–4 mM). The immunoblot showed a concentration depen-



Time-dependent inhibition of human hepatic microsomal UGTs by ketoprofen glucuronide. A, inhibition of UGT2B1 activity by ketoprofen glucuronide (●, 1.47 mM; ○, 3.45 mM; ■, 3.65 mM; ▲, 3.91 mM) with PB-treated rat liver microsomes (600 μ g) in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl₂ at 25°C. Glucuronidation reaction was evaluated using 1-naphthol as substrate. B, inhibition of UGT2B7 activity by ketoprofen glucuronide (●, 0.91 mM; ■, 2.37 mM; □, 2.71 mM) with membrane fractions of transfected V79 cells (770 μ g) in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl₂ at 25°C. Glucuronidation reaction was evaluated using 2-naphthol as substrate. Inactivations were quenched at the indicated times and the residual activity, A/Ao, was determined, as described in Materials and Methods. Each data point is the mean $\pm$ S.D. of three separate determinations.

dence of the intensity of the band corresponding to the 56-kDa protein (results not shown).

To investigate further whether UGTs were indeed targets of ketoprofen glucuronide, purification by DEAE ion-exchange chromatography was carried out with solubilized PB-treated rat liver microsomes containing the protein adducts. SDS-PAGE analysis followed by Coomassie blue staining (Fig. 4A) showed a major polypeptide in the final purified material with an apparent molecular mass of 56 kDa, which immunoreacted with both anti-UGT and antiketoprofen antibodies (Fig. 4, B and C, lanes 4, 5, and 6). Immunoblot analysis of purified UGTs from nontreated rat liver microsomes, performed as control, showed no signal revealed by antiketoprofen antibodies. Interestingly, by contrast to unmodified UGTs, UGTs incubated with ketoprofen glucuronide failed to bind on a Blue Sepharose CL-6B column, used as a final affinity chromatography step, suggesting an important change in protein structure or conformation upon interaction with the metabolite (data not shown).

Photoaffinity experiments with [β -³²P]5N₃UDP-GlcUA were performed with membrane fractions of UGT2B7-transfected HK293 cells (Fig. 5) preincubated with 0 (control) or 5 mM ketoprofen glucuronide. The inhibitory potency of 5 mM ketoprofen glucuronide on the glucuronidation of androstenedione catalyzed by UGT2B7 was about 50%. The analysis of the autoradiograms of the photolabeled proteins preincubated with 5 mM ketoprofen glucuronide showed a significant decrease (about 30%) of photoincorporation of the probe into UGT2B7 protein. Similar results were obtained when human or rat liver microsomes were photolabeled with the probe (results not shown). These data suggest that the ketoprofen adducts, which partially prevented the photolabeling of the UGTs, would compete with the probe for the UDP-GlcUA binding site, resulting in UGT inhibition.

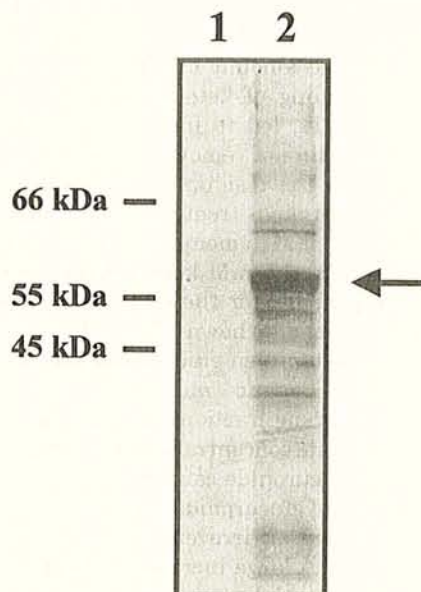


Fig. 3. Western blot analysis of ketoprofen-protein adducts. Four hours after treatment of PB-treated rat liver microsomes with 0 (1) or 2.5 mM (2) of ketoprofen glucuronide, the proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to an Immobilon-P membrane, and probed with antiketoprofen antibodies. Amount of protein loaded was 100 μ g/lane. Arrow indicates the 56-kDa protein band.

Situ Irreversible Binding of Ketoprofen Glucuronide to Proteins. The experiments described above showed *in vitro* formation of adducts in subcellular fractions. To determine whether the irreversible binding of ketoprofen glucuronide also occurred in whole cells in culture, nontransfected and UGT2B1-transfected V79 cells were exposed for 24 h to culture medium containing either ketoprofen at a concentration of 1 mM or the vehicle [5% dimethyl sulfoxide (v/v)]. We verified that the formation of ketoprofen glucuronide by the UGT2B1-transfected V79 cells was effective. Ketoprofen glucuronide (5.75 ± 0.45 nmol) was formed and secreted into the extracellular medium when the UGT2B1-transfected V79 cells were incubated for 24 h with 1 mM ketoprofen and 5 mM glucose as a precursor for UDP-

GlcUA formed intracellularly, corresponding to a concentration of about $0.5 \mu\text{M}$. We then measured the amount of 2-naphthol glucuronide released into the culture medium from control and ketoprofen-treated UGT2B1-transfected cells and the amount of irreversibly bound ketoprofen glucuronide (Table 1). Following exposure of the UGT2B1-transfected cells to ketoprofen, we observed a significant decrease of approximately 35% of 2-naphthol glucuronidation that was correlated with adduct formation.

To confirm the irreversible binding of ketoprofen glucuronide to proteins *in situ*, cells treated as described above were analyzed by immunofluorescence microscopy using anti-UGT and antiketoprofen antibodies (Fig. 6). UGT2B1-transfected V79 cells showed a typical endoplasmic reticulum fluorescence pattern, when they were stained by anti-UGT antibodies (Fig. 6C), in accordance with the membrane endoplasmic reticulum localization of UGTs. A similar distribution of the fluorescence signal was observed when the UGT2B1-transfected V79 cells were treated with ketoprofen and probed with antiketoprofen antibodies (Fig. 6A). As a control, we checked that UGT2B1-transfected V79 cells exhibited no fluorescence staining when they were not treated with ketoprofen and probed with antiketoprofen antibodies (data not shown). In addition, no fluorescence signal was observed when control V79 cells, which do not express UGTs, were exposed to 1 mM ketoprofen for 24 h and then immunolabeled with anti-UGT antibodies (data not shown) and antiketoprofen antibodies (Fig. 6B). This indicates that adduct formation occurred only when ketoprofen glucuronide was synthesized. Moreover, treatment of UGT2B1-transfected V79 cells with 1 mM ketoprofen in the presence of 2 mM 7,7,7-triphenylheptanoic acid, a strong inhibitor of UGTs (Fournel-Gigleux et al., 1989) that caused a 85% inhibition of UGT activity toward 2-naphthol, led to the abolishment of the immunofluorescent staining when antiketoprofen antibodies were used (data not shown). These results suggest that the biosynthesis of ketoprofen glucuronide is a prerequisite for ketoprofen-protein adduct

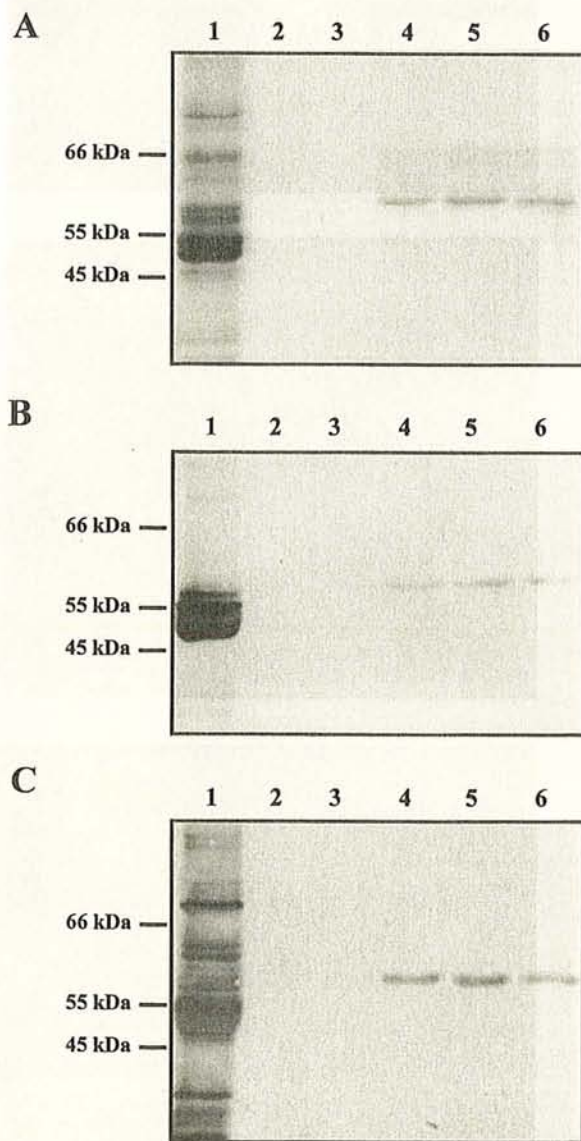


Fig. 4. Purification of UGT adducts. Four hours after treatment of PB-treated rat liver microsomes with 5 mM ketoprofen glucuronide, the microsomes containing the protein adducts were solubilized by CHAPS and applied to a DEAE-Sephacel column, as described in *Material and Methods*. Solubilized microsomal proteins (lane 1) and fractions eluted from the column with 100 mM KCl (lanes 2, 3, 4, 5, and 6) were separated by SDS-PAGE and detected by Coomassie blue (A) or transferred to an Immobilon-P membrane and probed with anti-UGT (B) and antiketoprofen (C) antibodies.

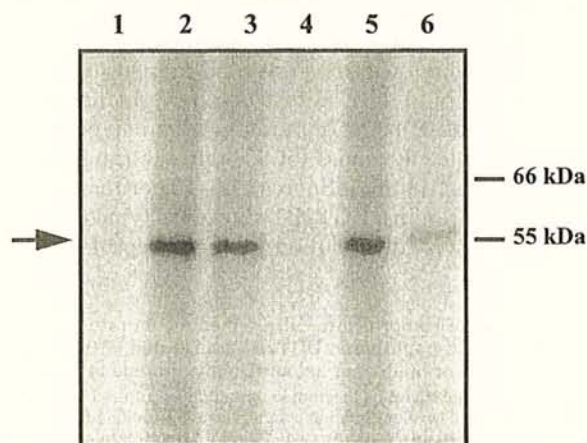


Fig. 5. Effect of ketoprofen glucuronide on the photoaffinity labeling of UGT2B7 with $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}_3\text{UDP-GlcUA}$. Membrane fractions of UGT2B7-transfected HK293 cells were incubated in the absence (control and lanes 1, 2, and 3) or the presence (lanes 4, 5, and 6) of 5 mM ketoprofen glucuronide for 30 min, as described in *Materials and Methods*. Proteins (50 μg) were then photolabeled with 40 μM $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}_3\text{UDP-GlcUA}$ by UV-irradiation (254 nm) for 90 s. Lanes 1 and 4 are experiments without UV-irradiation, and lanes 3 and 6 are protection experiments done in the presence of 0.4 mM unlabeled UDP-GlcUA. Labeled proteins were separated by SDS-PAGE and followed by autoradiography, as described in *Material and Methods*. Autoradiograph represents one representative experiment from two independently repeated experiments.

tion in situ and that the target proteins are mainly localized in the endoplasmic reticulum of the cells, which corresponds to the intracellular localization of UGTs.

Discussion

Because of its role in the transport of drugs and metabolites, serum albumin has been found by us and others to be a target of acylglucuronides of various NSAIDs, including ketoprofen, both in vitro and in vivo (Ojingwa et al., 1994; Terrier et al., 1996). Intracellular targets of acylglucuronides have been far less investigated. Wang and Dickinson (1998) detected the presence of protein adducts (110 and 120 kDa) in liver homogenates with diflunisal acylglucuronide. Because these metabolites are generated by UGTs, we investigated the possibility that these enzymes may be the primary targets of acylglucuronides. Microsomal UGTs and the recombinant UGT2B1 and UGT2B7, which have been identified as the main isoforms involved in the glucuronidation of NSAIDs in rat and humans, have been considered.

Our studies revealed that ketoprofen glucuronide was a potent in vitro inhibitor of glucuronidation reaction catalyzed by human liver microsomes or by UGT2B1. We showed that this inhibition was irreversible and was related to the formation of ketoprofen glucuronide covalently bound to microsomal proteins. Relatively few amounts of ketoprofen glucuronide covalently bound to human liver microsomes or UGT2B1-V79 membrane fraction (0.25 and 0.03 nmol ketoprofen glucuronide per mg of total microsomal proteins, respectively) were able to completely abolish UGT activities in vitro. In the same way, the concentration of ketoprofen glucuronide formed endogeneously in V79 fibroblasts expressing UGT2B1 was enough to generate protein adducts and to decrease, by 35%, the glucuronidation potency of this cellular system toward 2-naphthol. These results suggested that the irreversible inhibition occurred via the covalent binding of acylglucuronide to a key domain of the enzyme.

We provided the following experimental evidences strongly supporting this hypothesis. First, Western blot analysis using antiketoprofen antibodies revealed that several intracellular proteins bind the ketoprofen acylglucuronide, but among those was a major immunoreactive polypeptide with an apparent molecular mass (56 kDa) in the range of that of UGTs. Moreover, immunofluorescence experiments on V79 cells stably expressing UGT2B1 showed a typical endoplasmic reticulum-type distribution of the ketoprofen adducts,

which was similar to that of the UGTs. Finally, we successfully purified to apparent homogeneity UGT proteins from rat liver microsomal fractions that had reacted with ketoprofen glucuronide. The purified UGTs were recognized by both

A



B



C

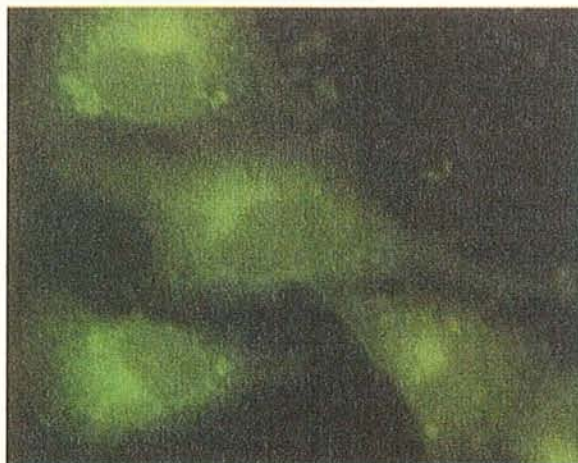


Fig. 6. Visualization by fluorescence microscopy of ketoprofen-protein adducts formed in situ. Twenty-four hours after treatment with 1 mM ketoprofen, UGT2B1-transfected (A) or nontransfected (control) (B) V79 cells were fixed, permeabilized, and stained with antiketoprofen antibodies and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG. UGT protein in UGT2B1-transfected cells was also visualized with anti-UGT antibodies and FITC-conjugated donkey anti-goat IgG (C). Original magnification, 1000 $\times$.

TABLE 1

Effect of addition of ketoprofen to culture medium on rate of glucuronidation of 2-naphthol in UGT2B1-transfected V79 cells and on formation of covalent binding of ketoprofen glucuronide to proteins. Measurement of 2-naphthyl- β -D-glucuronide formation in cultured UGT2B1-transfected V79 cells and of covalent binding of ketoprofen glucuronide to proteins were performed as described in *Materials and Methods* after treatment by dimethyl sulfoxide [0.5% (v/v)] or ketoprofen [1 mM dissolved in dimethyl sulfoxide, 0.5% (v/v)]. Results are expressed as nmol of 2-naphthol glucuronide formed/90-mm dish or, in parentheses, as a percentage of residual activity (ratio of glucuronidation activity in the presence and absence of ketoprofen). Results are mean $\pm$ SD of three separate experiments.

UGT2B1	Glucuronidation Activity ^a	Covalent Binding ^b
Control	43.9 $\pm$ 5.0 (100)	0
Ketoprofen	29.3 $\pm$ 1.9 (66.7 $\pm$ 4.3)	30.0 $\pm$ 4.2

^aGlucuronidation activity is expressed as nmol ketoprofen glucuronide formed/90 min $\times$ 10 h.

^bCovalent binding of ketoprofen glucuronide to proteins is expressed as pmol ketoprofen bound/mg of protein.

antibodies raised against UGTs or ketoprofen, indicating that UGTs are targets of ketoprofen glucuronide.

The photoaffinity experiments showed that ketoprofen glucuronide competed with the radiolabeled probe, an analog of UDP-GlcUA, to bind the UGTs, providing the information that the metabolite may react with the UDP-GlcUA binding site of UGT2B7. On the other hand, ketoprofen glucuronide was able to inhibit different UGT isoforms (IC_{50} ranged from 1.5–5 mM), especially UGT1A6 (data not shown). This protein glucuronidates mainly planar and short phenols as well as naproxen, but with a low activity (Ebner and Burchell, 1993). The interaction of ketoprofen glucuronide with the active site of UDP-GlcUA, which is highly conserved among UGT isoforms (Mackenzie et al., 1997), would explain that the inhibition exerted by ketoprofen glucuronide is not specific with regard to the different UGT isoforms. Moreover, UGT2B1 and UGT2B7 are known to glucuronidate, besides NSAIDs, several types of chemically different substrates, including morphine, catechol estrogens, and androsterone. The inhibition resulting from adduct formation may therefore impair the metabolism of these physiologically active compounds.

With human serum albumin, a nucleophilic displacement of the glucuronic acid moiety leads to the covalent attachment of *R*-ketoprofen by acylation and to the release of glucuronic acid. The Schiff base mechanism of the adduct formation involves acylmigration from the carbon 1 of the sugar moiety on the other carbon atoms, subsequent opening of the sugar ring, and imine formation between the free aldehyde of glucuronic acid and the protein. Under these conditions, the acylglucuronide is bound to the protein via glucuronic acid (Presle et al., 1996). Because these two mechanisms are likely to occur simultaneously at physiological pH, we suggest that the complex irreversible inhibition, revealed by the biphasic kinetics, could reflect the existence of these reactions, which are known to proceed at different rates. Indeed, an attempt to investigate the mechanism of adduct formation using synthesized radiolabeled acylglucuronide (on the glucuronic acid moiety) was undertaken. No band could be detected upon incubation of the probe with microsomal proteins, even after 1 month of exposure. We explain this result by the fact that, either the specific activity of the radioactive metabolite was too low, or the binding proceeded via a nucleophilic displacement, which implies the release of labeled glucuronic acid. More work is needed with the use of radiolabeled ketoprofen to discriminate between a Schiff base and a nucleophilic mechanism.

Evidence of toxicity induced by electrophilic acylglucuronides has been demonstrated, especially for NSAIDs of the class of arylalkyl carboxylic acids. A high incidence of anaphylactic reactions has been described for NSAIDs, such as zomepirac, which has been removed from the market. Ketoprofen has also been reported to be responsible for such reactions, although not frequently (Tardy et al., 1989). The molecular mechanism of these immune reactions has not been elucidated yet. Because these substances are mainly metabolized into acylglucuronides in humans, the reactivity of this electrophilic species toward target proteins favored the hapten hypothesis (Spahn-Langguth and Benet, 1992). Worrall and Dickinson (1995) showed that diflunisal acylglucuronide was an immunogen in rats, supporting the hypothesis that covalent modification of macromolecules by acylglu-

curonides can lead to the production in vivo of circulating antibodies, which may be involved in immune responses and drug hypersensitivity. Indeed the presence of UGTs as hepatocellular autoantigens has been described in patients with autoimmune or viral hepatitis (Manns and Obermayer-Straub, 1997). The question that arises from these data concerns the consequences of the formation of UGT adducts and the possibility of modified UGTs acting as autoantigens in vivo situations in humans. Work is in progress to find out whether such a mechanism accounts for the immune reactions observed in some patients taking carboxylic NSAIDs.

Acknowledgments

We thank Pr. B. Burchell (Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, UK) for kindly providing the UGT1A6 cDNA that was used to construct the eucaryotic expression vector, and for the anti-rat liver UGT antibodies. Dr. P. Mackenzie (Flinders Medical Center, Bedford Park, Australia) is acknowledged for donating the cDNA used to express UGT2B1 and Dr. T. Tephly (University of Iowa, Iowa City, IA) for his kind gift of HK293 cells expressing UGT2B7. Dr. E. Battaglia (Brigham and Women's Hospital, Boston, MA) and J. Little (University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR) are acknowledged for the critical reading of the manuscript.

References

- Battaglia E, Pritchard M, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Radomska A, Siest G and Magdalou J (1994) Chemical modification of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 by diethyl pyrocarbonate: Possible involvement of a histidine residue in the catalytic process. *Arch Biochem Biophys* 309:266–272.
- Castillo M and Smith PC (1995) Disposition and reactivity of ibuprofen and ibufenac acyl glucuronides *in vivo* in the rhesus monkey and *in vitro* with human serum albumin. *Drug Metab Dispos* 23:566–572.
- Coffman BL, King CD, Rios GR and Tephly TR (1998) The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268). *Drug Metab Dispos* 26(1):73–77.
- Coffman BL, Rios GR and Tephly TR (1996) Purification and properties of two rat liver phenobarbital-inducible UDP-glucuronosyltransferases that catalyze the glucuronidation of opioids. *Drug Metab Dispos* 24:329–333.
- Coughtrie MWH, Burchell B, Leakey JEA and Hume R (1988) The inadequacy of perinatal glucuronidation: Immunoblot analysis of the developmental expression of individual UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat and human liver microsomes. *Mol Pharmacol* 34:729–735.
- Dragacci S, Hamar-Hansen C, Fournel-Gigleux S, Lafaurie C, Magdalou J and Siest G (1987) Comparative study of clofibrate acid and bilirubin glucuronidation in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 36:3923–3927.
- Drake RR, Igari I, Lester R, Elbein A and Radomska A (1992) Application of 5-azido-UDP-glucose and 5-azido-UDP-glucuronic acid photoaffinity probes for the determination of the active site orientation of microsomal UDP-glucosyltransferases and UDP-glucuronosyltransferases. *J Biol Chem* 267:11360–11365.
- Ebner T and Burchell B (1993) Substrate specificities of two stably expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* 21:50–55.
- Fournel-Gigleux S, Shepherd SRP, Carré MC, Burchell B, Siest G and Caubère P (1989) Novel inhibitors and substrates of bilirubin: UDP-glucuronosyltransferases, arylalkylcarboxylic acids. *Eur J Biochem* 183:653–659.
- Hargus SJ, Amouzadeh HR, Pumford NR, Myers TG, McCoy SC and Pohl LR (1994) Metabolic activation and immunochemical localization of liver protein adducts of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Chem Res Toxicol* 7:575–582.
- Haumont M, Magdalou J, Ziegler JC, Bidault R, Siest JP and Siest G (1991) Immobilization of microsomes into alginate beads is a convenient method for producing glucuronides from drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:440–446.
- Hogboom GH (1955) Fractionation of cells components of 2 animal tissues: General method for isolation of liver cells components. *Methods Enzymol* 1:16–19.
- Hyneck ML, Smith PC, Munafa A, McDonagh AF and Benet LZ (1988) Disposition and irreversible plasma protein binding of tolmetin in human. *Clin Pharmacol Ther* 44:107–114.
- King AR and Dickinson RG (1993) Studies on the reactivity of acyl glucuronides-IV. Covalent binding of diflunisal to tissues of the rat. *Biochem Pharmacol* 45:1043–1047.
- Kretz-Rommel A and Boelsterli UA (1994) Selective protein adducts to membrane proteins in cultured rat hepatocytes exposed to diclofenac: Radiochemical and immunochemical analysis. *Mol Pharmacol* 45:237–244.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 227:680–685.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Roy-Chowdhury J, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KK and Nebert DW (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7:255–269.

- Gauthier R, Buronfosse T, Magdalou J, Herber R, Besse S, Delatour P and Pit E (1998) Species-dependent enantioselective glucuronidation of carprofen. *Xenobiotica* 28:595–604.
- MP and Obermayer-Straub P (1997) Cytochromes P450 and uridine diphosphate-glucuronosyltransferases: Model autoantigens to study drug-induced, virus-induced, and autoimmune liver disease. *Hepatology* 26:1054–1066.
- ra JC, Spahn-Langguth H and Benet LZ (1994) Irreversible binding of tolmetide macromolecules via its glucuronide: Binding to blood constituents, tissue oogenes and subcellular fractions *in vitro*. *Xenobiotica* 24:495–506.
- JA, Moon RC, Anders MW, Fenselau C and Shane B (1992) Enhancement of metabolic activity by conjugation reactions. *J Nutr* 122:615–624.
- N, Lapique F, Fournel-Gigleux S, Magdalou J and Netter P (1996) Stereoselective irreversible binding of ketoprofen glucuronides to albumin. *Drug Metabolism* 24:1050–1057.
- ard M, Fournel-Gigleux S, Siest G, Mackenzie P and Magdalou J (1994) A recombinant phenobarbital-inducible rat liver UDP-glucuronosyltransferase (T2B1) stably expressed in V79 cells catalyses the glucuronidation of morphine, alcohols and carboxylic acids. *Mol Pharmacol* 45:42–50.
- PC, Benet LZ and McDonagh AF (1990) Covalent binding of zomepirac glucuronide to proteins: Evidence for a Schiff base mechanism. *Drug Metabolism and Disposition* 18:639–644.
- H, Nätthke I, Mohri K, Zia-Amirhosseini P and Benet LZ (1990) Preliminary characterization of proteins to which benoxaprofen glucuronide binds irreversibly. *Pharm Res (NY)* 7:S257.
- Spahn-Langguth H and Benet LZ (1992) Acyl glucuronides revisited: Is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metabolism and Reviews* 24:573–577.
- Tardy B, Page Y, Guy C, Comtet C, Thevenet D, Bertrand M and Bertrand JC (1989) Anaphylactic shock induced by ketoprofen. *Thérapie* 44:68.
- Upton RA, Buskin JN, Williams RL, Holford NHG and Riegelman S (1980) Negligible excretion of unchanged ketoprofen, naproxen and probenecid in urine. *J Pharm Sci* 69:1254–1257.
- Wang M and Dickinson RG (1998) Disposition and covalent binding of diflunisal and diflunisal acylglucuronide in the isolated perfused rat liver. *Drug Metabolism and Disposition* 26:98–104.
- Worrall S and Dickinson RG (1995) Rat serum albumin modified by diflunisal acyl glucuronide is immunogenic in rats. *Life Sci* 56:1921–1930.

Send reprint requests to: Dr. S. Fournel-Gigleux, Unité Mixte de Recherche 7561 Centre National de la Recherche Scientifique-Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculty of Medicine, BP 184 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. E-mail: sfg@fmed.u-nancy.fr

1.2.2. Interaction du kétoprofényle CoA avec les UGT

Le kétoprofényle CoA, généré lors de l'inversion chirale du kétoprofène, est un métabolite réactif susceptible de former des adduits avec les protéines et d'être incorporé dans les lipides membranaires. Ainsi, le kétoprofényle CoA pourrait interagir avec les UGT, dont l'activité est fortement phospholipidodépendante, et perturber leur fonction enzymatique. Notre objectif est de tester la réactivité potentielle du kétoprofényle CoA sur l'activité catalytique des UGT. En outre, afin de comparer la réactivité de deux métabolites du kétoprofène, acylglucuronide et kétoprofényle CoA, nous avons analysé leur effet inhibiteur sur la glucuronoconjugaison ainsi que les mécanismes impliqués.

Pour ce faire, le kétoprofényle CoA et le glucuronide de kétoprofène sont séparément préincubés avec des fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6. La glucuronoconjugaison du 1-naphtol catalysée par cette enzyme est ensuite évaluée. Les résultats, indiqués sur la figure 26, montrent que le kétoprofényle CoA, comme le glucuronide de kétoprofène, inhibe la glucuronoconjugaison catalysée par l'UGT1A6. L'inhibition est, dans les deux cas, dépendante de la concentration en métabolite. Cependant, si les valeurs de CI_{50} (1,25 mM et 1,37 mM pour le glucuronide de kétoprofène et le kétoprofényle CoA, respectivement) sont du même ordre de grandeur pour ces deux composés, les cinétiques d'inhibition sont différentes. En effet, l'inhibition par le glucuronide de kétoprofène passe d'environ 25% à une concentration de 1 mM à environ 75% à une concentration de 1,5 mM, soit environ 50% d'inhibition pour une différence en acylglucuronide de 0,5 mM. Le kétoprofényle CoA, à la concentration de 1,4 mM, est responsable d'environ 50% d'inhibition, alors qu'à la concentration de 2,7 mM en métabolite, l'enzyme conserve cependant 45% d'activité résiduelle. Ainsi, aux fortes concentrations en métabolites, le pouvoir inhibiteur du glucuronide de kétoprofène sur l'UGT1A6 est plus important que celui du kétoprofényle CoA. De plus, contrairement au glucuronide de kétoprofène, l'inhibition observée pour le kétoprofényle CoA n'atteint jamais 100%.

Nos précédents résultats montrent que le glucuronide de kétoprofène est un inhibiteur irréversible de la glucuronoconjugaison catalysée par des microsomes hépatiques humains et des fractions membranaires de cellules V79-UGT2B1 (Terrier *et al.*, 1999). Ainsi, pour déterminer le mécanisme de l'inhibition par le kétoprofényle CoA et pour le comparer au mécanisme d'inhibition par le glucuronide de kétoprofène, des fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6 sont incubées en présence de glucuronide de kétoprofène (figure 27A) ou de kétoprofényle CoA (figure 27B), à la fois à des concentrations variant de 0 à 4 mM et pendant des temps variables (0 à 30 minutes). Les résultats montrent que les deux métabolites sont responsables d'une inhibition dépendante du temps, suggérant que ces inhibitions sont irréversibles, et également de la concentration en inhibiteur. Ce résultat suggère que le kétoprofényle CoA se fixe de manière irréversible sur l'UGT1A6 (acylation de la protéine), certainement sur un domaine important pour l'activité catalytique de la protéine. L'inhibition par le kétoprofényle CoA suit deux phases d'inactivation : une inactivation très rapide entre 0 et 5 minutes, puis une inactivation lente, de 5 à 30 minutes. Cependant, même pendant la période d'inhibition rapide (figure 27B), l'inhibition par le kétoprofényle CoA reste beaucoup plus faible que l'inhibition par le glucuronide de kétoprofène. En effet, même à 4 mM de kétoprofényle CoA, l'inhibition ne dépasse pas 60 %.

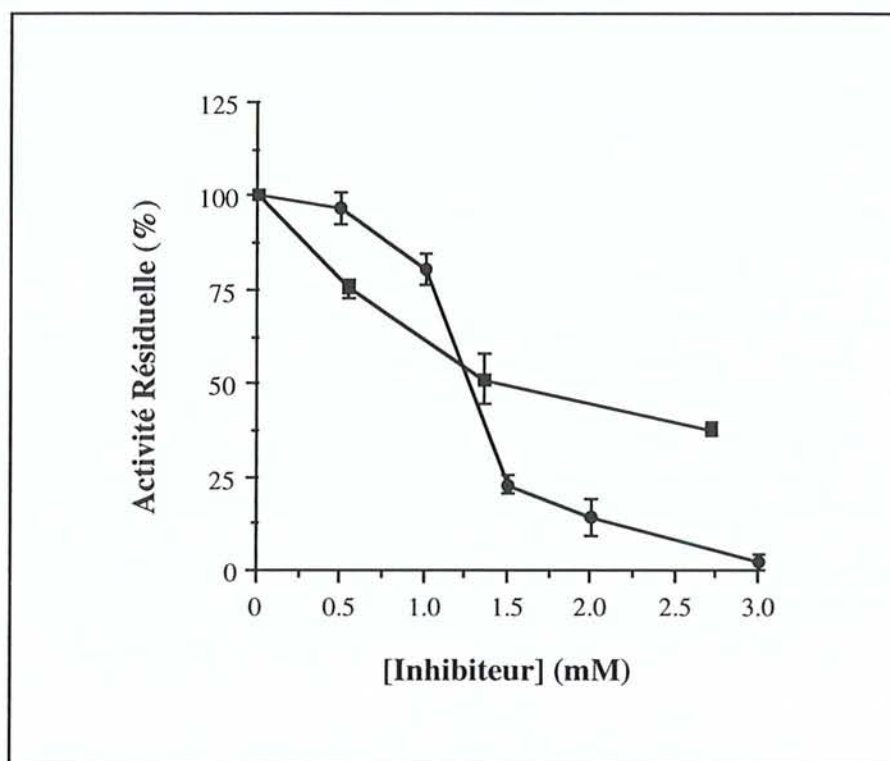


Figure 26. Inhibition par le glucuronide de kétoprofène et le kétoprofényle CoA de la glucuronoconjugaison du 1-naphtol catalysée par l'UGT1A6.

L'inhibition est réalisée à 25°C, en incubant les fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6 avec le glucuronide de kétoprofène (●) ou le kétoprofényle CoA (■). L'inactivation est arrêtée à 30 minutes et l'activité catalytique est évaluée vis-vis du 1-naphtol par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence, comme décrit au chapitre *Matériel et Méthodes*. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle et correspondent à la moyenne obtenue pour trois essais $\pm$ SD. L'activité spécifique initiale en absence d'inhibiteur est de $29,8 \pm 0,8$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines.

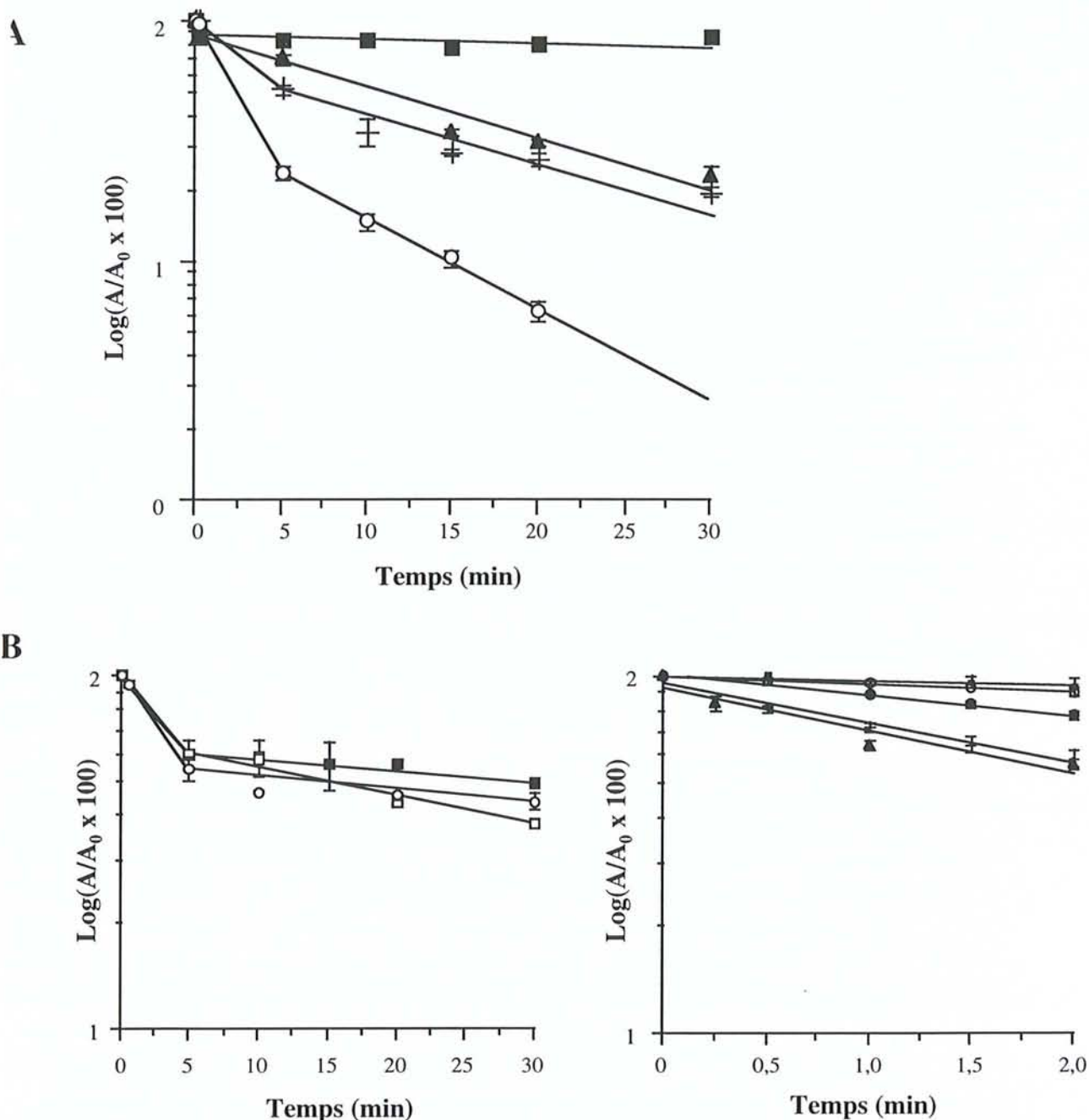


Figure 27. Cinétiques des inhibitions par le glucuronide de kétoprofène (A) et le kétoprofényle CoA (B) de la glucuronoconjugaison du 1-naphtol catalysée par l'UGT1A6.

L'inhibition est réalisée à 25°C, en incubant les fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6 avec le glucuronide de kétoprofène (A, ■, 1 mM; ▲, 1,5 mM; +, 2 mM; ○, 3 mM) ou le kétoprofényle CoA (B, □, 2,2 mM; ○, 3 mM; ■, 3,9 mM et ■, 1,4 mM; ○, 2,1 mM; ●, 2,8 mM; ▲, 3,9 mM; +, 4,1 mM). L'inactivation est arrêtée aux temps indiqués et l'activité catalytique est évaluée vis-à-vis du 1-naphtol par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence, comme décrit au chapitre *Matériel et Méthodes*. Les résultats sont exprimés en logarithme du pourcentage d'activité résiduelle ($\text{Log}(A/A_0 \times 100)$) et correspondent à la moyenne obtenue pour trois essais $\pm$ SD. L'activité spécifique initiale en absence d'inhibiteur est de $29,8 \pm 0,8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines.

Nos résultats indiquent donc que les deux métabolites se fixent irréversiblement sur l'UGT1A6, avec pour conséquence une inhibition de la glucuronoconjugaison catalysée par cette protéine. Nous avons montré que le glucuronide de kétoprofène se fixe dans le site actif de l'UDPGA (partie C-terminale de la protéine), commun à l'ensemble des isoformes d'UGT, et serait ainsi à l'origine de l'inhibition de la glucuronoconjugaison. Il est logique de penser que le kétoprofényle CoA se fixerait, quant à lui, plutôt dans le site actif de l'aglycone (partie N-terminale de la protéine), ce qui expliquerait la différence d'inhibition entre les deux métabolites. Les mécanismes mis en œuvre dans ces deux types d'inhibition seront discutés ultérieurement.

1.3. Réactivité de métabolites d'acides carboxyliques endogènes

1.3.1. Interaction des acylglucuronides d'acide rétinoïque tout-trans et d'acide lithocholique avec les UGT et les CRABP

Publication 2

Retinoyl- β -D-glucuronide and 5,6-epoxy-retinoic acid are novel ligands for cellular retinoic acid binding proteins I and II as identified by photoaffinity labeling with [3 H] all *trans*-retinoic acid

Anna Radomska-Pandya, Guangping Chen, Victor M. Samokyszyn, Joanna M. Little, Walter E. Gall, Gregory Zawada, **Nadège Terrier**, Jacques Magdalou, Piotr Czernik
Manuscrit soumis

1.3.1.1. Interaction des acylglucuronides d'acide rétinoïque tout-trans et d'acide lithocholique avec les UGT

Nous avons précédemment montré que l'acylglucuronide de kétoprofène inhibe la glucuronoconjugaison catalysée par les UGT en se liant de manière covalente au site de fixation de l'UDPGA. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la réactivité d'autres acylglucuronides, formés notamment à partir d'acides carboxyliques endogènes. Notre choix s'est porté sur les acylglucuronides d'acide rétinoïque tout-*trans* et d'acide lithocholique.

Les résultats, présentés dans la publication, montrent que l'acylglucuronide d'acide lithocholique est responsable de l'inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison catalysée par les UGT (microsomes hépatiques humains, UGT1A6, UGT2B7). Dans le but de déterminer le site de fixation du glucuronide d'acide lithocholique sur les UGT, des expériences de marquage de photo-affinité de microsomes hépatiques humains et de fractions membranaires de cellules HK293-UGT2B7 ont été mises en œuvre avec la sonde photo-activable [β - 32 P]5N₃UDPGA, en présence de l'acylglucuronide. Les résultats, représentés sur la figure 28, montrent que le glucuronide d'acide lithocholique inhibe la photo-incorporation de la sonde sur les UGT. Ce résultat suggère que, comme le glucuronide de kétoprofène, le glucuronide d'acide lithocholique se fixe de manière covalente dans le site actif de l'UDPGA, à l'origine de l'inhibition de la glucuronoconjugaison. Cependant, les cinétiques de l'inhibition de la glucuronoconjugaison de l'androstérone, catalysée par l'UGT2B7, sont différentes pour les deux acylglucuronides. En effet, la figure 29 montre que l'inhibition due au glucuronide de kétoprofène est dépendante du temps, alors que l'inhibition par le glucuronide d'acide lithocholique est immédiate et stable dans le temps. Le glucuronide d'acide rétinoïque, quant à lui, n'est pas un inhibiteur de la glucuronoconjugaison catalysée par les UGT. Nous émettons deux hypothèses pour expliquer ce résultat. La première est que le glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* ne forme pas d'adduit avec les UGT. La deuxième est que ce glucuronide pourrait se fixer de manière covalente sur les UGT, mais sur un domaine peptidique qui ne serait pas impliqué dans la catalyse de la protéine.

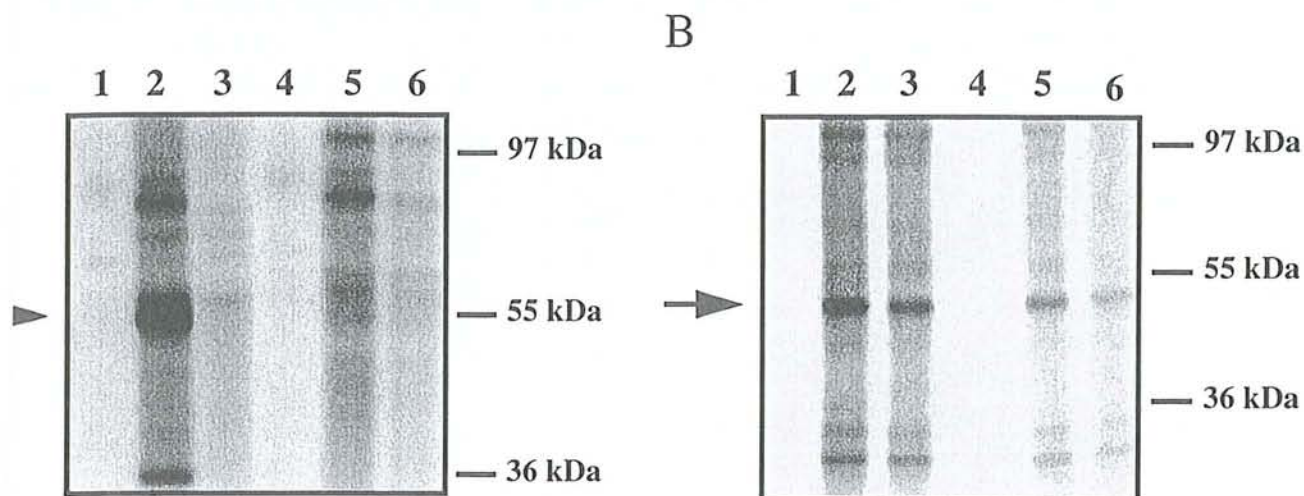


Figure 28. Effet du glucuronide d'acide lithocholique sur le marquage de l'auto-affinité des microsomes hépatiques humains (A) et de l'UGT2B7 (B) avec la sonde photoactivable $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3$ UDPGA.

Les microsomes hépatiques humains (A) et les fractions membranaires de cellules HK293-UGT2B7 (B) sont réincubés à 25°C, pendant 30 minutes, en absence (contrôle et puits 1, 2 et 3) ou en présence (puits 4, 5 et 6) de 5 mM de glucuronide d'acide lithocholique, comme décrit au chapitre *Matériel et Méthodes*. Les protéines (50 µg) sont ensuite marquées avec 40 µM de la sonde photoactivable $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3$ UDPGA sous irradiation UV (254 nm) pendant 90 secondes. Les puits 1 et 4 correspondent aux expériences sans irradiation de la sonde sous UV et les puits 3 et 6 aux expériences de protection réalisées en présence de 0,4 mM d'UDPGA non radiomarké. Les protéines radiomarkées sont séparées sur gel d'électrophorèse et visualisées par autoradiographie, comme décrit au chapitre *Matériel et Méthodes*. La flèche indique la position des UGT.

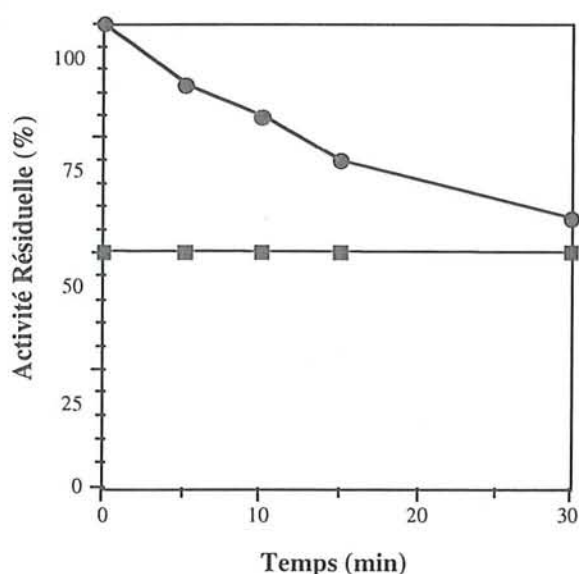


Figure 29. Inhibition par les glucuronides de kétoprofène et d'acide lithocholique de la glucuronoconjugaison de l'androstérone catalysée par l'UGT2B7.

L'inhibition est réalisée à 25°C, en incubant les fractions membranaires de cellules HK293-UGT2B7 avec le glucuronide de kétoprofène (●, 3,5 mM) ou le glucuronide d'acide lithocholique (■, 0,5 mM). L'inactivation est arrêtée aux temps indiqués et l'activité catalytique est évaluée vis-à-vis de l'androstérone par CCM couplée à la radiodétection, comme décrit au chapitre *Matériel et Méthodes*. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle. L'activité spécifique initiale en absence d'inhibiteur est de 1,5 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines.

Nous avons donc montré que le glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* n'est pas un inhibiteur de la glucuronoconjugaison. Au contraire, les glucuronides de kétoprofène et d'acide lithocholique se lient irréversiblement au site de fixation de l'UDPGA sur les UGT. La formation de ces adduits est cependant à l'origine de différents modes d'inhibition de la glucuronoconjugaison. Nous discuterons ultérieurement des bases mécanistiques susceptibles d'être à l'origine de la différence de réactivité observée pour ces trois acylglucuronides.

1.3.1.2. Interaction de l'acylglucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* avec les CRABP

Il a été précédemment suggéré que le glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* serait actif et posséderait des propriétés thérapeutiques plus intéressantes que les rétinoïdes, en raison en particulier de son absence de tératogénicité (Mehta *et al.*, 1991). De telles propriétés biologiques impliquent une interaction avec les récepteurs nucléaires des rétinoïdes faisant intervenir au préalable un transport vers ces récepteurs. Les CRABP I et II sont les protéines cytosoliques responsables du transport des rétinoïdes (Napoli, 1996). Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* serait un ligand potentiel des CRABP, permettant ainsi son transport jusqu'aux récepteurs nucléaires des rétinoïdes. Cette hypothèse a déjà fait l'objet d'études dont les résultats sont controversés. En effet, certains auteurs ont montré que l'interaction du glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* avec les CRABP résulte en fait de l'hydrolyse du glucuronide en acide rétinoïque tout-*trans* (Sani *et al.*, 1992). Aussi, pour pallier aux problèmes d'instabilité du glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans*, nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'une technique d'investigation alternative comme le marquage de photo-affinité au moyen de l' $[^3\text{H}]$ acide rétinoïque.

Les objectifs de cette étude sont de valider l'utilisation de l' $[^3\text{H}]$ acide rétinoïque comme sonde photo-activable et de l'appliquer à l'identification du glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* comme ligand des CRABP I et II.

Nous avons vérifié que l' $[^3\text{H}]$ acide rétinoïque peut être utilisé comme une sonde photo-activable spécifique du site de fixation de l'acide rétinoïque tout-*trans* des CRABP, sous forme monomérique (15 kDa) ou dimérique (30 kDa). Les résultats montrent que le marquage de photo-affinité par $[^3\text{H}]$ acide rétinoïque est dépendant du temps de l'irradiation sous UV ainsi que de la concentration en sonde photo-activable et que ce phénomène est saturable. De plus, des expériences de protection des CRABP par l'acide rétinoïque tout-*trans* et par des ligands des CRABP non radiomarqués montrent une inhibition de la photo-incorporation de la sonde $[^3\text{H}]$ acide rétinoïque dépendante de la concentration en ligands non radiomarqués. Par ailleurs, des composés connus pour ne pas se lier aux CRABP I et II, comme le rétinol ou les isomères de l'acide rétinoïque tout-*trans* tels que l'acide rétinoïque 9- et 13-*cis*, n'inhibent pas la photo-incorporation de $[^3\text{H}]$ acide rétinoïque sur les CRABP.

Ces résultats ont permis de confirmer que la sonde photo-activable $[^3\text{H}]$ acide rétinoïque se fixe spécifiquement au niveau du site de l'acide rétinoïque tout-*trans* des CRABP. L'utilisation de cette sonde peut donc être exploitée pour étudier l'interaction de différents composés avec le site de fixation de l'acide rétinoïque tout-*trans*.

L'identification du β -D-glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* comme nouveau ligand des CRABP est le résultat marquant de cette étude. Nous avons montré que le glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* inhibe la photo-incorporation de l' $[^3\text{H}]$ acide rétinoïque sur les CRABP, suggérant que ce métabolite entre en compétition avec la sonde photo-activable pour interagir spécifiquement avec le site de fixation de l'acide rétinoïque. Le glucuronide d'acide rétinoïque tout-*trans* peut donc être considéré comme un ligand des CRABP.

Retinoyl- β -D-glucuronide and 5,6-epoxy-Retinoic Acid are Novel Ligands for Cellular Retinoic Acid Binding Proteins I and II as Identified by Photoaffinity Labeling with [3 H] All *trans* - Retinoic Acid

Anna Radomska-Pandya^{†#}, Guangping Chen[‡], Victor M. Samokyszyn[§], Joanna M. Little[‡], Walter E. Gall[‡], Gregory Zawada[‡], Nadege Terrier[‡], Jacques Magdalou[¶], Piotr Czernik[‡]

From the [‡]Department of Biochemistry and Molecular Biology and the [§]Department of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas 72205, and [¶]Faculté de Medecine, UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

[#]To whom correspondence should be addressed:

Anna Radomska-Pandya
Department of Biochemistry and Molecular Biology
University of Arkansas for Medical Sciences
4301 W. Markham, Slot 516
Little Rock, Arkansas 72205
Tel: (501) 686-5414
Fax: (501) 603-1146
e-mail: radomskaanna@exchange.uams.edu

Running title: Novel ligands of CRABP I and II.

This work was supported in part by NIH grants DK-45123 and DK-49715 (to ARP) and R29ES06756 (VMS).

SUMMARY

Cellular retinoic acid binding proteins (CRABPs) are carrier proteins thought to play a crucial role in the transport and metabolism of all-*trans*-retinoic acid (RA) and its derivatives within the cell. This report describes a novel photoaffinity-based binding assay involving competition between potential ligands of CRABP and [^3H]RA for binding to the RA-binding site of CRABP I and II. Photoaffinity labeling of purified CRABPs with [^3H]RA was light- and concentration-dependent, saturable, and protected by several retinoids in a concentration-dependent manner, indicating that binding occurred in the CRABP RA-binding site. Structure-function relationship studies demonstrated that oxidative changes to the RA b-ionone ring did not effect ligand potency. However, derivatives lacking a terminal carboxyl group and some cis isomers did not bind to CRABPs. These studies also identified two novel ligands for CRABPs: 5,6-epoxy-RA and retinoyl-b-D-glucuronide (RAG). Experimental evidence excluded RAG non-specific binding to CRABPs and UDP-glucuronosyltransferases, enzymes responsible for RAG synthesis. These results established that RAG is an effective ligand of CRABPs. Therefore, photoaffinity labeling with [^3H]RA can be used to identify new ligands for CRABP and retinoid nuclear receptors and also provide information concerning the identity of amino acid(s) localized in the RA-binding site of these proteins.

INTRODUCTION

Cellular retinoic acid binding proteins (CRABPs¹) are carrier proteins involved in the intracellular transport and metabolism of all-*trans*-retinoic acid (RA) and other retinoid derivatives. CRABP I and II have been extensively characterized in relation to their tissue distribution, developmental pattern of expression, gene regulation, (including regulation by retinoids), and substrate specificity (1). The physiological function of CRABPs is still not completely understood, however, CRABPs are thought to protect RA and modulate intracellular RA transport and metabolism (2,3). It has been postulated that both CRABPs help regulate the concentrations of cytosolic retinoids, since both CRABP I and II are expressed in tissues known to be sensitive to high retinoid levels (4). CRABP can also play an important role in sequestering RA within the cell. In addition, there is evidence that CRABP can channel RA into various metabolic pathways. It has been shown that the RA-CRABP I complex is a substrate in the catabolism of RA by cytochrome P-450 as well as several other enzymatic reactions involving retinoids (5-7). Retinoids influence cellular signaling through interactions with the nuclear retinoic acid and retinoid receptors, RAR and RXR (8). Recently, distinct roles have been demonstrated for CRABP I and II in regulating signaling by RA (9). Over the last several years, retinoids have served as important therapeutic agents in the fields of dermatology and oncology (10-12).

The major ligand for CRABP I and II is RA. It has been demonstrated that RA and its metabolites are involved in diverse cellular activities including cellular growth, differentiation and morphogenesis, and the regulation of gene expression (13,14). Several other important ligands for both CRABPs have been previously identified. CRABPs have no binding affinity for retinyl esters, however, they do bind many retinoid analogs containing modifications to the b-ionone ring, including such RA metabolites as 4-OH-RA, 4-oxo-RA, 18-OH-RA, and 3,4-didehydro-RA (15). Evidence from mutagenesis studies and the inability of CRABPs to bind all-*trans*-retinol (ROH) or all-*trans*-retinal (15) implied a preference for ligands with a terminal carboxyl group.

Glucuronidation is an important metabolic pathway of retinoids *in vivo*. Relatively high plasma concentrations of retinoid glucuronides have been demonstrated in experimental animals (16-18). Despite the discovery of the presence of RAG in human plasma (19), its physiological significance has yet to be elucidated. Recently, the ability of human liver microsomes and recombinant UGT2B7 to biosynthesize carboxyl- and hydroxyl-linked glucuronides of RA and its oxidized derivatives has been demonstrated (20). It has been shown that acylglucuronides of RA and its derivatives exhibit significant biological activity. They are less cyto- and teratotoxic than the parent compound, yet retain its capacity to drive cell growth, differentiation, and proliferation (21-24). RAG is also being considered as a possible agent for cancer chemoprevention and dermatological applications (25,26). Although these observations indicate the underlying importance of retinoid glucuronides, the physiological significance of these compounds in the cell and their effect on cancer is not completely understood.

To elucidate the physiological functions of RAG, its interactions with CRAB proteins were re-examined in these studies. Photoaffinity labeling with [11,12-³H]RA ([³H]RA), which is covalently and specifically bound to CRABP I and II (27) within the RA-binding site, was used as a tool to characterize and identify new ligands for CRABP. The outcome from these experiments implied that the binding was specific and directed to the RA-binding site of CRABPs and identified two novel CRABP I and II ligands, RAG and 5,6-epoxy-RA. Several experiments were performed that excluded nonspecific binding of RAG to CRABP I and II and UDP-glucuronosyltransferases (UGTs). The fact that RAG may be a natural ligand for CRABP I and II may have important physiological and therapeutic consequences.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of cellular retinoic acid binding proteins. Rat CRABP I and II were biosynthesized and purified by HPLC with an imidazole acetate gradient (pH 6.6) as previously described (28). Pooled protein peaks were neutralized using Tris buffer and concentrated; the concentrations of CRABP I and II were 1.33 mg/ml and 1.2 mg/ml, respectively.

Materials. RA, 9-*cis*-RA, 13-*cis*-RA, retinol (ROH), 13-*cis*-ROH, and [¹⁴C]1-naphthol were purchased from Sigma (St. Louis, MO). [³H]Androsterone ([³H]A) and [³H]RA were purchased from NEN Life Science Products (Boston, MA). Stock solutions of the retinoids were prepared fresh in methanol; all retinoids were stored at -20°C under argon and all procedures involving these compounds were performed under yellow light. All other reagents were of the highest grade commercially available.

Synthesis of retinoid ligands and the acylglucuronides. The 5,6-epoxy RA and 4-OH-RA used in these assays were synthesized in our laboratory as described by Samokyszyn (20). RAG synthesis was carried out as previously described by Becker (29). Ketoprofen acylglucuronide (KPGF) was prepared as described by Terrier (30) and lithocholic acylglucuronide (LAG) was prepared using methods described by Panfil (31).

Human liver microsomes. Human liver microsomes were prepared from transplantable livers according to the method of Dragacci et al (32)

Membrane fractions of recombinant cells expressing UGT1A6 or UGT2B7. The development of the recombinant V79 cell line (Chinese hamster lung fibroblasts) stably expressing the human liver UGT1A6 and of the recombinant HK293 cell line (human embryonic kidney cells) stably expressing human UGT2B7 has been described previously (33,34). Enriched membrane fractions of all recombinant cells were obtained from the cell homogenate by differential ultracentrifugation as previously described (35). The enriched membrane fractions were stored in aliquots at -80°C. No decrease in the enzymatic activity of the recombinant UGT1A6 and UGT2B7 was observed for up to 6 months under these conditions.

Photoaffinity labeling with [³H]RA. CRABP I and II were photolabeled with [³H]RA using a method modified from Bernstein *et al* (27). An aliquot of [³H]RA was dried and dissolved in methanol to a final concentration of 66 mM. CRABP I and II were diluted to 0.05 mg/ml with buffer (50 mM HEPES-NaOH buffer, pH 7.5) and 9 ml of this solution was used per assay. Unlabeled potential ligands (retinoids and other structurally similar compounds; structures shown in Fig. 1) were added in 0.5 µl ethanol at varying concentrations (0, 5, 25, 125 mM, final concentration). For controls (zero concentration), 0.5 ml ethanol was added. The reaction mixtures (10 ml final volume) were incubated for 2 minutes on ice and 0.5 ml [³H]RA (3.3 mM final concentration) was added and incubated on ice for an additional 5 minutes. The samples were irradiated with a long wave (354 nm) UV light source (Spectroline model ENF-260C; Spectronics Corp., Westbury, NY) for 15 minutes on ice.

Following irradiation, 4 ml of NuPAGE denaturing buffer (Novex, San Diego, CA) was added to each sample. Samples were vortexed, sonicated for 3 minutes, heated at 100° C for 5 minutes and then applied to a 1 mm NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Novex). Proteins were separated at 200 volts in NuPAGE MES-SDS running buffer (Novex). Following electrophoresis, the gels were stained with Coomassie Blue, destained (10% 95% ethanol, 10% glacial acetic acid), washed with water, treated with Autofluor (National Diagnostics, Manville, NJ) for 30 minutes and dried. Dried gels were subjected to autoradiography at -80°C for 2-5 days. Autoradiographs were analyzed and quantified by densitometry.

Measurement of UGT activity. Androsterone and 1-naphthol were used as substrates to measure the glucuronidation catalyzed by UGT2B7 expressed in HK293 cells, UGT1A6 expressed in V79 cells, and human liver microsomes. UGT activity toward androsterone was measured with radioactive aglycon and unlabeled UDP-GlcUA as the sugar donor, as previously described (36,37). The substrate was prepared in the form of mixed micelles with Brij 58 as described in detail in (36). For the assays, recombinant UGT2B7 (approximately 15 µg) and the substrate (0.1 mM final concentration) were incubated in a total volume of 60 µl with the following reaction components: 100 mM Tris-HCl buffer, pH 6, 5 mM MgCl₂, 0.05% Brij 58. Reactions were started by adding 50 mM UDP-GlcUA (4.17 mM final concentration). The reactions were incubated at 37° C for 30 minutes and were stopped with 20 µl ethanol, vortexed, and placed on ice. Sixty microliters of the reaction mix was applied directly to the preadsorbent layer of a 19-channeled silica gel TLC plate (Baker 250Si-PA (19C); VWR Scientific, Sugarland, TX) and dried. Plates were developed in chloroform/methanol/glacial acetic acid/water (65:25:2:4, v/v). After development, plates were dried, sprayed with EN³HANCE (New England Nuclear, MA) and subjected to autoradiography at -80°C for 3-7 days. Silica gel containing labeled metabolites (glucuronide bands were localized using the autoradiographs) and that from corresponding areas in control lanes was scraped into vials and radioactivity was determined by scintillation counting (Beckman model LS 5000 TD, Beckman Inst., Fullerton, CA.).

Glucuronidation of 1-naphthol was determined using a method adapted from Bock and White (38). Human liver microsomes and membrane fractions of UGT1A6-V79 cells (approximately 10 µg protein) were incubated with 1 mM 1-naphthol in 100 µl of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer containing 10 mM MgCl₂. The reaction was initiated by the addition of UDP-GlcUA (2 mM final concentration). After 30 min incubation at 37°C, the reaction was stopped with 10 µl of 6N HCl and the unconjugated substrate was extracted into 4 ml chloroform. After centrifugation for 10 min at 2,000 x g, 50 µl of the aqueous phase was removed and added to 1.95 ml of 0.1M NaOH. Fluorescence measurements of 1-naphthyl-β-D-glucuronide, at excitation and emission wavelengths of 290 and 330 nm, respectively, were carried out on a LS-5 fluorescence spectrophotometer (Perkin-Elmer, Foster City, CA) with authentic 1-naphthyl-β-D-glucuronide (0 to 10 nmol, Sigma) as standard.

Irreversible *in vitro* inhibition of glucuronidation by acylglucuronides. For the analysis of the potential irreversible inhibition, RAG, LAG and KPFG were incubated with different sources of UGTs (human liver microsomes, membrane fractions of UGT1A6-transfected V79 cells or UGT2B7-transfected HK293 cells). Solutions of RAG and LAG were prepared just before use in the form of mixed micelles with Brij 58 (final concentration of detergent in the reaction mixture, 0.05%); KPFG was dissolved in water. Inactivation experiments were performed at room temperature in 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, containing 5 mM D-saccharic acid 1,4-lactone, an inhibitor of β -glucuronidases, by preincubating proteins with various concentrations (0.5 to 5 mM) of acylglucuronides. A control without any acylglucuronide was run simultaneously, corresponding to 100 percent activity. Following preincubation, the activity of the UGTs toward androsterone and/or 1-naphthol was estimated as described above.

RESULTS

Characterization of photoaffinity labeling of CRABP I with [11, 12-³H]-all-trans-retinoic acid. The photoaffinity labeling with [³H]RA is a direct process characterized by using an unmodified ligand (RA) for covalent binding to the RA-binding site. Direct photoaffinity labeling with [³H]RA has been utilized previously to characterize RA-binding proteins. Bernstein *et al.* (27) showed that [³H]RA, which contains an α,β -unsaturated carbonyl group and an isoprenyl chain, can serve as an effective photoaffinity label for RA-binding proteins found in the cytosol and membranes from various bovine tissues. Binding of atRA to the RA-binding site of both CRABPs was evaluated by studying the effect of irradiation, along with the concentration-dependence and saturability of [³H]RA-binding to purified CRABP I. As shown in Fig. 2 (lanes b-e), photoaffinity labeling of pure, recombinant CRABP I (15 kDa) with [³H]RA was concentration-dependent. At an RA concentration of 3.3 μ M (Figure 2, lane d), the CRABP protein (3.1 mM) reached saturable RA-binding, agreeing stoichiometrically with the model of one molecule of RA-binding to one molecule of CRABP (39-41).

Competition experiments with unlabeled RA showed that the photoincorporation of [³H]RA into CRABP I was protected in a concentration-dependent manner as shown by the diminishment of photolabeling as the concentration of unlabeled RA increased from 5 μ M to 125 μ M (Figure 2, lanes 1-4). Figure 2 also demonstrates that ROH failed to compete with [³H]RA for CRABP I binding. The results presented in Figure 2 clearly indicated that photolabeling of CRABP I was light-dependent, concentration-dependent, and protected by unlabeled RA in a concentration-dependent manner. This latter observation indicated that [³H]RA was bound within the RA-binding site. Interestingly, another photolabeled band at 30 kDa appeared in all experiments where CRABP I was labeled with [³H]RA. This demonstrated that, in buffer solution and the presence of RA and following irradiation, CRABP I can form covalently bound dimers. All data presented in Fig. 2 support the application of photoaffinity labeling with [³H]RA to CRABP protein characterization.

Structure-function relationships of CRABP I investigated with different derivatives of retinoic acid. The CRABP photoaffinity labeling system was evaluated with several known CRABP ligands and a few potential new ligands (for structures, see Fig. 1) to establish the validity of the competitive binding assay (Figs. 3 and 4). Oxidized derivatives that differ in the substituents present on the β -ionone ring of the RA molecule, such as 5,6-epoxy-RA, 4-OH-RA, and 4-oxo-RA, were analyzed for their ability to compete with RA for the RA-binding site of CRABP. It is evident from these experiments that all oxidized derivatives are excellent ligands for CRABP I (Figure 3A), including 5,6-epoxy RA, identified here for the first time as a ligand for CRABP I.

An investigation of the *cis* vs. *trans* isoprenyl chain configuration of RA and its role in CRABP binding determined that there was no significant competition between the 13-*cis* RA derivatives and [³H]RA for the RA-binding site of CRABP I. On the other hand, the 9-*cis* derivatives showed significant competition at high concentrations.

This work also confirmed that the carboxyl function of RA is essential for binding to CRABPs. Neither methyl-4-OH-RA (data not shown), which contains a methyl group on the terminal carboxyl function of RA, nor 13-*cis* ROH, nor ROAc competed with [³H]RA for the RA-binding site of CRABP (Fig. 3C). Dolichol, which lacks the typical retinoid ring, but has the familiar isoprenyl chain with a substituted -OH group, was not a ligand for CRABP proteins (Fig. 3C).

RAG as a new ligand for CRABP I. The results of additional photoaffinity labeling experiments verified RAG as a new ligand for CRABP I. Figure 4 shows that RAG could compete for the RA-binding site of CRABP and, thus, is an effective ligand for CRABP I. From the data presented here, it is evident that RAG is an excellent ligand for CRABPs. These data support the assumption that for a retinoid derivative to be a ligand, it must contain a carboxyl group. RAG has a free carboxyl group on its glucuronic acid moiety, therefore, RAG could fit into the RA-binding pocket of CRAB proteins.

This finding contradicted previously published results (42). Therefore, TLC and HPLC assays were performed to ensure that RAG remained intact following photoaffinity labeling, rather than being hydrolyzed to free RA (data not shown). Additional experiments were performed to exclude the possibility that RAG's interaction with CRABP I might be due primarily to its potential reactivity as an acylglucuronide. The reactivity of acylglucuronides with various cellular proteins was recently demonstrated by Terrier et al. (30). KPFG used in these studies as a model for reactive acylglucuronides, failed to compete with [³H]RA for the RA-binding site of CRABP I (Figure 4).

Studies of the potential interactions of acylglucuronides with microsomal and recombinant UGTs. Studies were undertaken to determine whether the interaction between RAG and CRABP was non-specific (i.e., not directed to the RA active site). For this purpose, RAG, KPFG and LAG were synthesized and tested for their ability to react with human liver microsomes, phenol-specific human recombinant UGT1A6 and RA-specific human recombinant UGT2B7. As shown in Fig. 7, KPFG and LAG (but not RAG) irreversibly inhibited the glucuronidation of 1-naphthol and/or androsterone catalyzed by human liver microsomes, UGT1A6 and/or UGT2B7. This indicated that RAG, an acylglucuronide of the physiological substrate RA, does not exhibit potentially toxic interactions with cellular proteins.

Characterization of photoaffinity labeling of CRABP II with [³H]RA. CRABP II was photolabeled in a concentration-dependent manner with [³H]RA. Increasing concentrations of several substrates, such as 5,6-epoxy-RA, RAG, 4-OH-RA, and ROH, were tested for their ability to compete for the RA-binding site on CRABP II (Figure 6). The results suggest that in

addition to RA, 4-OH-RA, 5,6-epoxy-RA and RAG possess high affinity for CRABP II. Also, ROH failed to compete for the RA-binding site of CRABP II as previously demonstrated for CRABP I. These data indicate that both of the CRAB proteins accepted or rejected the same ligands.

Amino acid alignment. The amino acid alignment of RA-binding proteins such as RAR, CRABP I and II and UGT2B7, which catalyzes the glucuronidation of RA, was analyzed. There is an interesting correlation of amino acid sequences among these proteins involved in interactions with RA (Fig. 9), which shows obvious amino acid sequence homologies and structural features within regions directly involved in protein-ligand interactions. The RAR and CRAB proteins analyzed here (Fig. 9) reveal the presence of functional residues at homologous positions. R131/132 of CRABPs engaged in direct contact with the RA carboxylate aligns with R274 of RAR, postulated to be involved in electrostatic interactions with the ligand. R278 of RAR, which anchors the RA carboxylate, aligns with R135/136 of CRABPs. K236 of RAR, which binds to oxygen 21 of the RA carboxylate, corresponds to K92/93 of CRABPs.

A prediction of the binding site for RA in the human UGT2B7 based on homologies to CRABP I and CRABP II sequences and their X-ray crystallographic structures has been published recently (43). This analysis revealed that the amino acid sequence, TKTELEN, may be a central motif in the UGT2B7 binding pocket for RA. The binding pocket should accommodate the addition of a glucuronic acid moiety to RA without steric hindrance. This may be also true for RAR, CRABP I and CRABP II proteins since there are structural and sequence homologies among these proteins in the region of the TKTELEN motif in UGT2B7.

DISCUSSION

This report describes a novel competitive binding assay based on direct photoaffinity labeling of CRABPs by [^3H]RA. This photoaffinity assay was utilized to evaluate known ligands of CRABPs and to identify new ligands for RA-binding proteins.

The relationship between structure and function for several ligands was examined with this photoaffinity system. Three types of ligands were evaluated in these studies as shown in Fig. 1, A) compounds with an oxidized b-ionone ring: 4-OH-RA, 4-oxo-RA, and 5,6-epoxy RA; B) isomers of the isoprenyl chain: RA, 13-*cis*-RA, 9-*cis*-RA and dolichol; and C) compounds containing a modification of the carboxyl function: RA, RA methyl ester, 4-OH-retinyl acetate and ROH.

Our studies show that modification to the b-ionone ring with hydroxyl (4-OH-RA) or ketone (4-oxo-RA) functional groups did not significantly effect ligand binding to CRABP I (Figure 3A). Also, comparison of the binding affinities of 4-OH-RA and 5,6-epoxy-RA for CRABP I demonstrated that 5,6-epoxy-RA is far superior to 4-OH-RA as a ligand. This was a novel finding since 5,6-epoxy RA had not been previously identified as a ligand for CRABP. The ability of oxidized derivatives to serve as CRABP ligands, along with the fact that they are excellent substrates for glucuronidation (20), provides important new information on RA biotransformation and its relation to CRABPs.

Previous reports have implied that isomeric forms of RA, which have different configurations of isoprenyl side chains, are not, in general, good ligands for CRABPs. However, ongoing debates about this subject are presented in the literature (15,44-46). From our results, 9-*cis*-RA appears to be a relatively good ligand for CRABP I at high concentrations (Figure 3B, lane 4). On the other hand, the 13-*cis* stereoisomer failed to compete for the RA-binding site of CRABP I. Changing the configuration of the isoprenyl side chain, which alters the position of the carboxyl group, decreased the ability of isomeric forms of atRA to be ligands for CRABPs. Therefore, it is likely that this is one of the factors which determines CRABP specificity. An even more significant determinant of ligand specificity appeared to be the terminal carboxyl group. Alterations to this group (acetylation or methylation) eliminated ligand binding to CRABP I (Figure 3C), as has been shown previously by other investigators (15,44-46). The photoaffinity labeling experiments presented here also indicated that the absence of either the b-ionone ring or the carboxyl group completely abolished binding. Finally, ROH, which has been reported in the literature not to be a ligand for CRABP I or II (15), did not compete with [^3H]RA for binding to CRABP. In conclusion, our photolabeling approach confirmed previous results from other investigators, identified two new ligands and, more importantly, for the first time, allowed direct visualization of the radioactive protein/ligand complexes.

Following preincubation and irradiation of ligand and protein in solution, holo-CRABP I and II exist as monomers and dimers (shown in Figs. 2 and 6). Both species were formed following UV irradiation and showed concentration-dependence of [^3H]RA photoincorporation. This is the

first demonstration that CRABP I and II can form homodimers in solution. The nature of the dimers needs to be investigated further.

These studies have identified RAG as one of the best ligands for both CRABP I and II. This is another novel finding since previous experiments by other investigators using skin cytosols and sucrose density gradients have excluded RAG as a ligand for CRABPs (42). Figures 5 and 6 shows that RAG is an excellent competitor for RA-binding to CRABP I, exhibiting a binding potency similar to atRA.

Several experiments were performed to exclude the possibility of nonspecific RAG binding to CRABP I. Acylglucuronides, like RAG, are known to bind to cellular proteins. A number of drugs (diuretics, hypolipidemic agents, NSAIDs) and some endogenous compounds (bilirubin, fatty acids, bile acids, retinoids) that contain a carboxylic acid group, circulate and/or are excreted in the bile or urine as acylglucuronides. These compounds can undergo spontaneous hydrolysis, releasing the parent drug, or intramolecular rearrangements leading to b-glucuronidase-resistant 2-, 3- and 4-*O*-acyl isomers. KPFG has been previously shown to irreversibly bind to plasma proteins, most notably albumin (30). If these metabolites are exposed to tissue macromolecules, there is the possibility of forming protein adducts which may cause immunological side effects and hepatotoxicity. In addition, we have shown that UGTs, the enzymes responsible for biosynthesizing acylglucuronides, are irreversibly inhibited by preincubation with some of these reactive compounds (30).

Two types of experiments were performed to determine whether RAG binds to CRABP *via* covalent attachment to specific amino acids in the active site, or interacts nonspecifically with cellular proteins. In the first experiment, KPFG, one of the most reactive acylglucuronides, and RAG were each preincubated with CRABP I and then photolabeled with [³H]RA. KPFG failed to compete for the RA-binding site of CRABP I, whereas RAG did compete effectively with [³H]RA for binding to CRABP I. To further confirm that RAG was a specific ligand for CRABP I, the potential reactivity of RAG, KPFG and LAG toward microsomal and recombinant UGTs was examined. Using KPFG as a model NSAID and the two endogenous conjugates, RAG and LAG, it was found that KPFG irreversibly inhibited the glucuronidation of phenols catalyzed by human hepatic microsomes and human recombinant UGT isoforms. This inhibition correlated with the formation of ketoprofen-protein adducts (47). Under the same conditions, RAG failed to exhibit inhibitory properties toward microsomal or recombinant UGTs (Fig. 7A, B, C). In contrast, incubation of LAG with the same enzymes led to an inhibition of their catalytic activity (Fig. 7A, B, C). These experiments showed that different acylglucuronides have different reactivity toward cellular proteins. Finally, RAG does not appear to interact with intracellular proteins in a nonspecific manner.

The discovery that RAG can specifically interact with CRABPs may have important physiological implications. There are data in the literature that glucuronides of RA and other RA derivatives play a physiological role similar to that of free retinoids (21-24). The fact that RAG

can bind to and be transported by CRABPs may prove to be very important physiologically with regard to metabolism in the cell. It has also been hypothesized that enzymes of Phase I and II detoxification, such as P450s, UGTs and sulfotransferases, can regulate the level of ligands for nuclear receptors (48,49). RA, fatty acids, and steroid hormones are potential ligands that could be involved in this process. We have recently shown that RA undergoes active glucuronidation by human UGT2B7 (20). This information, together with the fact that the nuclear envelope is the only place in the cell other than the ER where UGTs are localized (50), indicated that RAG might have a more important physiological function than is currently appreciated.

From the results presented in this paper, it is evident that RAG is an excellent ligand for CRABPs. The presence of a carboxyl group on its glucuronic acid moiety complies with the assumed structural requirement of a free carboxyl group for retinoid derivatives to be active ligands. This finding is also in agreement with holo-CRABP crystallographic studies showing direct or water-mediated interactions between the RA carboxyl group and arginines in the binding site (39,40). The amino acid alignment of the RA-binding proteins, RAR, CRABP I and II, and UGT2B7, also supports this hypothesis. These proteins show obvious amino acid sequence similarities in regions directly involved in protein-ligand interactions. In particular, RAR and CRABP have arginines and lysines, potentially involved in electrostatic interactions with RA, at homologous positions. Moreover, a predicted binding site for RA in UGT2B7 (43), containing the amino acid sequence TKTELEN, shows potentially functional arginines and lysines at corresponding positions. Structural work on the cellular retinoic acid binding complexes (40) suggests that upon binding, CRABPs can force retinoic acid derivatives into high energy conformations, due to Van der Waals forces and hydrophobic interactions. Also, this report proposed that for ligands to have high affinity for CRABPs, the retinoid must superimpose on the RA structure. Specifically, TTNBP (4-[E-2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl]benzoic acid) (40), a biologically very active retinoid that contains C13-C18 benzene ring and C19 carboxyl group may bind to CRABPs through this mechanism. Three dimensional similarities between RAG and TTNBP with regards to the presence of ring structures containing carboxyl groups may indicate that RAG also undergoes conformational changes stabilized upon binding.

Our photoaffinity-based comparative assay can be also applied to the characterization of other retinoid-binding proteins, such as the nuclear receptors, RAR/RXR, and enzymes involved with retinoid metabolism. Due to differences in methodology, the affinities of CRABPs and the nuclear receptors for retinoids have not been directly compared. Our system for photolabeling of CRABPs with [³H]RA will allow this to be done. Finally, it is anticipated that by using photoaffinity labeling to characterize RA-binding proteins, such as CRABP and RARs, we will enhance our understanding of the complex interplay between the CRABPs, retinoids, and retinoid nuclear receptors.

References

1. Ong, D. E., Newcomer, M. E., and Chytil, F. (1994) in *The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine* (Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S., eds), pp. 283-317, Raven Press, New York
2. Zheng, W. L., and Ong, D. E. (1998) *Biol. Reprod.* **58**, 963-970
3. Wardlaw, S. A., Bucco, R. A., Zheng, W. L., and Ong, D. E. (1997) *Biol. Reprod.* **56**, 125-132
4. Dolle, P., Ruberte, E., Kastner, P., Petkovich, M., Stoner, C. M., Gudas, L. J., and Chambon, P. (1990) *Development* **110**, 1133-1151
5. Napoli, J. (1996) *FASEB J.* **10**, 993-1001
6. Napoli, J. L., Boerman, M. H. E. M., Chai, X., Zhai, Y., and Fiorella, P. D. (1995) *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **53**, 497-502
7. Fiorella, P. D., and Napoli, J. L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10538-10544
8. Takase, S., Ong, D. E., and Chytil, F. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 328-334
9. Dong, D., Ruuska, S., Levinthal, D., and Noy, N. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 23695-23698
10. Miller, W. H. (1998) *Cancer* **83**, 1471-1482
11. Hong, W. K., and Itri, L. M. (1994) in *The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine* (Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S., eds), pp. 597-630, Raven Press, New York
12. Peck, G. L., and DiGiovanna, J. J. (1994) Synthetic retinoids in dermatology. *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine* (Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S., Eds.), Raven Press, New York
13. Chambon, P. (1994) *Semin. Cell. Biol.* **5**, 115-125
14. Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., and Evans, R. M. (1994) in *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine* (Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S., eds), pp. 319-350, Raven Press, New York
15. Fiorella, P. D., Giguere, V., and Napoli, J. L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21545-21552
16. Dunagin, P. E., Meadows, E. H., Jr., and Olson, J. A. (1965) *Science* **148**, 86-87
17. Zile, M. H., Inhorn, R. C., and DeLuca, H. F. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3544-3550
18. McCormick, A. M., Kroll, K. D., and Napoli, J. L. (1983) *Biochemistry* **22**, 3933-3940
19. Barua, A. B., and Olson, J. A. (1986) *Am. J. Clin. Nutr.* **43**, 481-485
20. Samokyszyn, V. M., Gall, W. E., Zawada, G., Freyaldenhoven, M. A., Chen, G., and Radomska-Pandya, A. (1999) **Submitted**
21. Janick-Bruckner, D., Barua, A. B., and Olson, J. A. (1991) *FASEB J.* **5**, 320-325
22. Blaner, W. S., and Olson, J. A. (1994) in *The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine.* (Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S., eds), Second edition Ed., pp. 229-255, Raven Press, New York
23. Gallup, J. M., Barua, A. B., Furr, H. C., and Olson, J. A. (1987) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **186**, 269-274
24. Barua, A. B., and Olson, J. A. (1987) *Biochem.J.* **244**, 231-234
25. Mehta, R. G., Barua, A. B., Olson, J. A., and Moon, R. C. (1991) *Oncology* **48**, 505-509

26. Olson, J. A., Moon, R. C., Anders, M. W., Fenselau, C., and Shane, B. (1992) *J. Nutr.* **122**, 615-624
27. Bernstein, P. S., Choi, S.-Y., Ho, Y.-C., and Rando, R. R. (1995) *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **92**, 654-658
28. Jamison, R., Newcomer, M., and Ong, D. (1994) *Biochemistry* **33**(March), 2873-2879
29. Becker, B., Barua, A. B., and Olson, J. A. (1996) *Biochem. J.* **314**, 249-252
30. Terrier, N., Benoit, E., Senay, C., Lapique, F., Radomska-Pandya, A., Magdalou, J., and Fournel-Gigleux, S. (1999) *Mol. Pharm.* **56**, 226-234
31. Panfil, I., Lehman, P. A., Zimniak, P., Ernst, B., Franz, T., Lester, R., and Radomska, A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1126**, 221-228
32. Dragacci, S., Thomassin, J., Magdalou, J., Souhaili-El-Amri, H., Boissel, P., and Siest, G. (1987) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **32**, 485-491
33. Fournel-Gigleux, S., Sutherland, L., Sabolovic, N., Burchell, B., and Siest, G. (1991) *Mol. Pharmacol.* **39**, 177-183
34. Coffman, B. L., Rios, G. R., King, C. D., and Tephly, T. R. (1997) *Drug Metab. Disp.* **25**, 1-4
35. Battaglia, E., Pritchard, M., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S., Radomska, A., Siest, G., and Magdalou, J. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **309**, 266-272
36. Radomska-Pyrek, A., Zimniak, P., Chari, M., Golunski, E., Lester, R., and Pyrek, J. S. (1986) *J. Lipid Res.* **27**, 89-101
37. Radomska-Pyrek, A., Zimniak, P., Irshaid, Y. M., Lester, R., Tephly, T. R., and Pyrek, J. S. (1987) *J. Clin. Invest.* **80**, 234-241
38. Bock, K. W., and White, I. N. (1974) *Eur. J. Biochem.* **46**, 451-459
39. Thompson, J. R., Bratt, J. M., and Banaszak, L. J. (1995) *J. Mol. Biol.* **252**, 433-446
40. Kleywegt, G. J., Bergfors, T., Senn, H., LeMotte, P., Gsell, B., Shudo, K., and Jone, T. A. (1994) *Structure* **2**, 1241-1258
41. Li, E., and Norris, W. (1996) *Ann. Rev. Nutrition* **16**, 205-234
42. Sani, B. P., Barua, A. B., Hill, D. L., Shih, T. W., and Olson, J. A. (1992) *Biochem. Pharmacol.* **43**(4), 919-922
43. Radomska-Pandya, A., Czernik, P., Little, J. M., Battaglia, E., and Mackenzie, P. I. (1999) *Drug Metabolism Reviews* **313**, 817-900
44. Horst, R. L., Reinhardt, T. A., Goff, J. P., Koszewski, N. J., and Napoli, J. L. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **322**, 235-239
45. Sani, B., Grippo, J., and Levin, A. (1994) *Oncology* **13**, 21-27
46. Norris, A., Cheng, L., Giguere, V., Rosenberger, M., and Li, E. (1994) *Biochim Biophys Acta* **1209**, 10-18
47. Terrier, N., Fournel-Gigleux, S., Benoit, E., Lapique, F., and Radomska-Pandya, A. (1999) *Fundamental and Clinical Pharmacology* **13 (S1)**, 369s
48. Nebert, D. W. (1991) *Molec. Endocrinol.* **5**, 1203-1214
49. Nebert, D. W. (1994) *Biochemistry and Pharmacology* **47**, 25-37
50. Dutton, G. J. (1980) *Glucuronidation of Drugs and Other Compounds*, CRC Press Inc., Boca Raton, Fl.

Footnotes

¹The abbreviations used are: CRABP, cellular retinoic acid binding protein; RA, all-*trans*-retinoic acid; RAR, nuclear retinoic acid receptor; RXR, nuclear retinoid receptor; 13-*cis* RA, 13-*cis* -retinoic acid; 9-*cis* -RA, 9-*cis* retinoic acid; 4-OH-RA, 4-hydroxy-all-*trans*-retinoic acid; ROAc, all-*trans*-retinyl acetate; 5,6-epoxy-RA, 5,6-epoxy-all-*trans*-RA; KPFG, ketoprofen glucuronide; LA, lithocholic acid; LAG, lithocholic acid glucuronide; RAG, retinoic acid glucuronide; UGT, UDP-glucuronosyltransferase; UDP-GlcUA, UDP-glucuronic acid.

Figure 1. Structures of various retinoids. A (from left to right): RA, 4-OH-RA, 4-oxo-RA, 5,6-epoxy-RA; B (from left to right): RA, 13-*cis*-RA, 9-*cis*-RA, dolichol; C (from left to right): RA, RA methyl ester, ROAc, ROH.

Figure 2: Photoaffinity labeling of CRABP I by differing concentrations of [³H]RA and protection by unlabeled RA and ROH. 3.1 mM CRABP I was preincubated in 10 ml of 50 mM HEPES, pH 6.5, with increasing concentrations of the substrates before photolabeling with UV light at 366 nm for 10 min on ice. Lane 1, control with 0.825 mM [³H]RA and no exposure to UV light; lanes 2-5, concentration-dependence of [³H]RA (0.825, 1.65, 3.3, and 6.6 mM); lanes a-d, protection with increasing concentrations of unlabeled RA and ROH (0, 5, 25, and 125 mM).

Figure 3. Photoaffinity labeling of CRABP I by [³H]RA: Evaluation of various compounds as ligands for CRABP I. The experimental procedure was performed as described in the legend for Figure 1. A) Lanes 1-4 represent protection experiments using increasing concentrations of 5,6-epoxy-RA, 4-OH-RA, and 4-oxo-RA. B) Lanes 1-4 represent protection experiments using increasing concentrations of RA, 9-*cis*-RA, and 13-*cis*-RA. C) Lanes 1-4 represent protection experiments using increasing concentrations of dolichol, 13-*cis*-ROH, and ROAc. Concentration of competing retinoids (0, 5, 25, and 125 mM).

Figure 4. Photoaffinity labeling of CRABP I with [³H]RA and protection by RA, RAG, and KPFG. This experiment was performed as described in Experimental Procedures. A) Lane 1, control with ethanol; lanes 2-6 are protection experiments using increasing concentrations of RA, RAG, and KPFG (0-125 mM). B) Densitometric quantitation of photoaffinity labeling of CRABP I [³H]RA and protection with RA (l), RAG (o), and KPFG(t).

Figure 5. Densitometric quantitation of photoaffinity labeling of CRABP I with [³H]RA and protection various retinoids. This graph shows the degree of protection, as quantitated by densitometry, of CRABP I photolabeling by [³H]RA with various ligands. Protection with cold ROH (l), 4-OH-RA (m), 4-oxo-RA (t), 5,6-epoxy-RA (ñ), RAG (n), and RA (q).

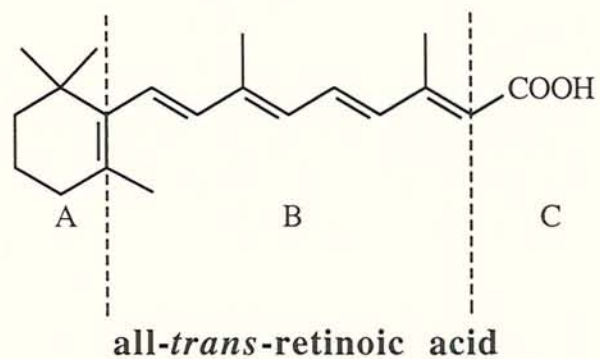
Figure 6. Photoaffinity labeling of CRABP II with [³H]RA and protection by various retinoids. This experiment was conducted in the same manner as described for CRABP I. Various retinoids were tested for their ability to protect against CRABP II photolabeling with [³H]RA. Lane a, control with 0.825 mM [³H]RA with no UV exposure, lanes

b-e, concentration-dependence with [^3H]RA (0.825-6.6 mM). Lanes 1-4, concentration-dependence (0-125 mM) of protection with RA, 5,6-epoxy-RA, RAG, 4-OH-RA, and ROH at 3.3 mM [^3H]RA.

Figure 7. Reactivity of acylglucuronides with UGTs. A) Experiments were carried out by incubating human liver microsomes at 25°C with various concentrations of KPFG (l) for 30 min and of RAG (s) and LAG (n) for 10 min in 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 10 mM MgCl_2 . Glucuronidation activity was evaluated using 1-naphthol as substrate. The initial specific activities for 1-naphthol was 39.4 ± 5.7 nmol/min x mg. B) Experiments were carried out by incubating membrane fractions of UGT2B7 transfected HK293 cells at 25°C with various concentrations of KPFG (l), RAG (s) and LAG (n) for 10 min in 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 10 mM MgCl_2 . Glucuronidation activity was determined using androsterone as substrate. The initial specific activity for androsterone was $1.5 \pm .5$ nmol/min x mg. C) Experiments were carried out by incubating membrane fractions of UGT1A6 transfected V79 cells at 25°C with various concentrations of KPFG (l), RAG (s) and LAG (n) for 10 min in 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 10 mM MgCl_2 . Glucuronidation activity was evaluated using 1-naphthol as substrate. The initial specific activity for 1-naphthol was 90.5 ± 13.9 nmol/min x mg.

Figure 8. Sequence alignment of human RAR α , human CRABP I and rat CRABP II proteins. The alignment shown was constructed using programs resident in Wisconsin Package Version 10.0 (Genetic Computer Group, Madison, WI) and refined according to available crystal structures (39,40). Shaded boxes indicate identical or homologous amino acids (D=E, I=L=V, S=T). Amino acids that contact RA carboxylate are indicated with stars. Lysine residues in hRAR α that mediate electrostatic interactions with RA are indicated with diamonds. Corresponding lysyl and arginyl residues in both CRABPs are indicated with vertical bars.

Figure 1



A				
B				$\text{H} - \left(\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}_2\text{C}=\text{CHCH}_2} - \right)_{20} - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}}$
C	-COOH		-CO ₂ CH ₃	-OH

Figure 2. Photoaffinity labeling of CRABP I by differing concentrations of [^3H]RA and protection by unlabeled RA and ROH

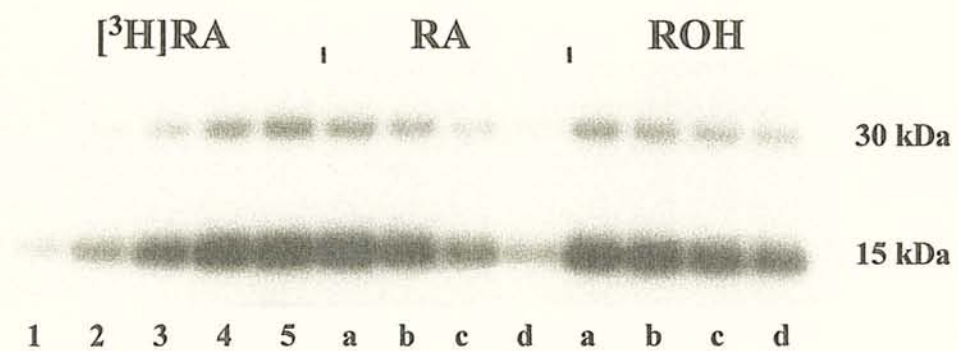


Figure 3. Photoaffinity labeling of CRABP I by [^3H]RA: Evaluation of various compounds as ligands for CRABP I

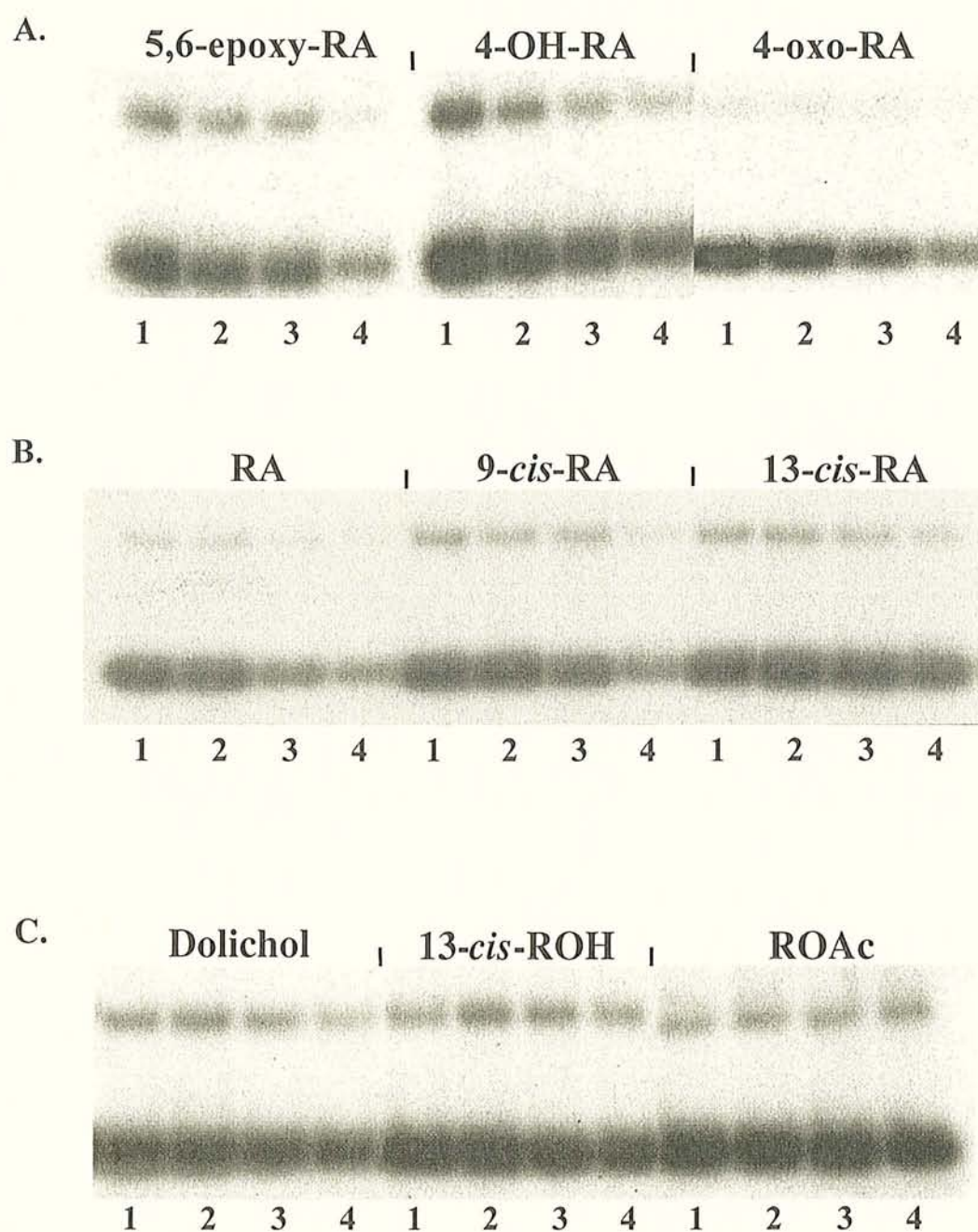
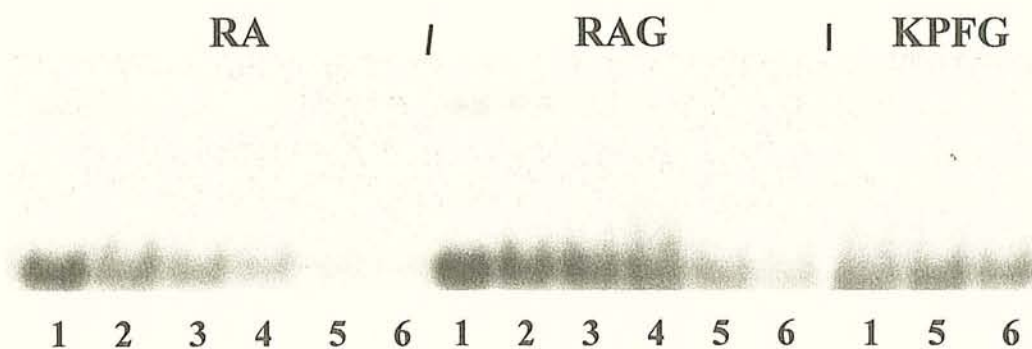


Figure 4. Photoaffinity labeling of CRABP I with [3H]RA and protection by RA, RAG, and KPFG

A.



B.

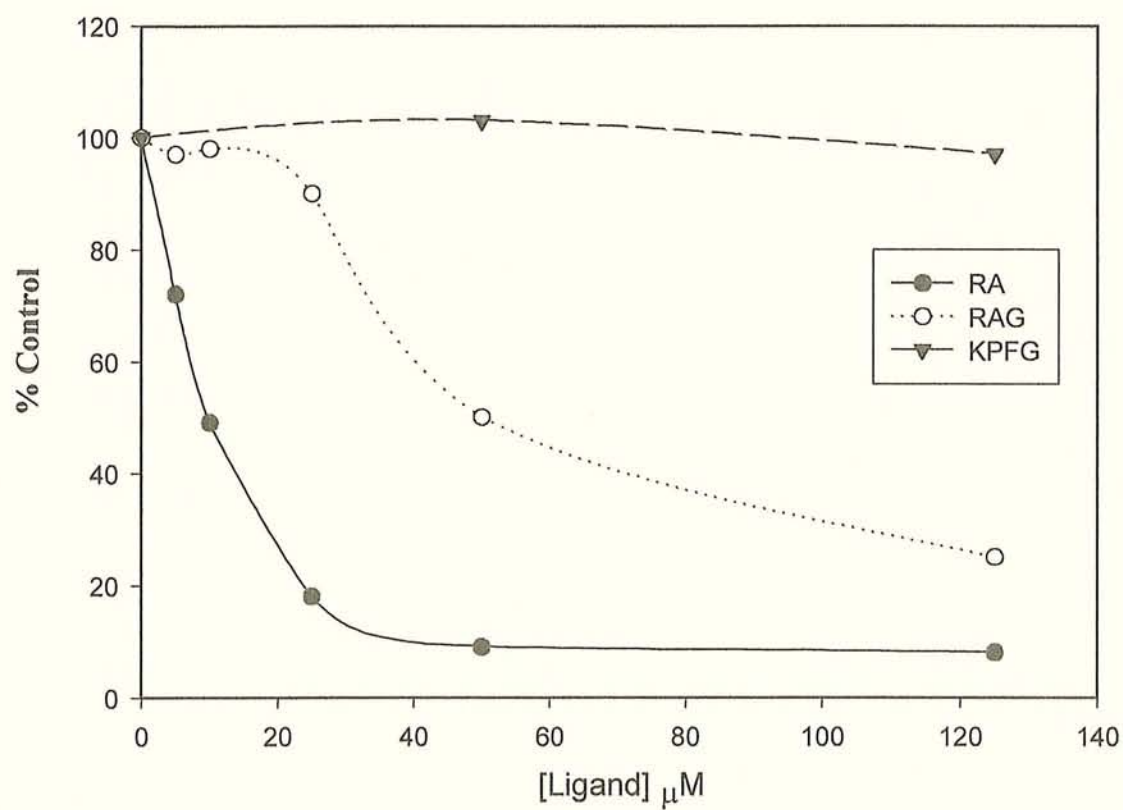


Figure 5. Densitometric quantitation of photoaffinity labeling of CRABP I with [³H]RA and protection by various retinoids

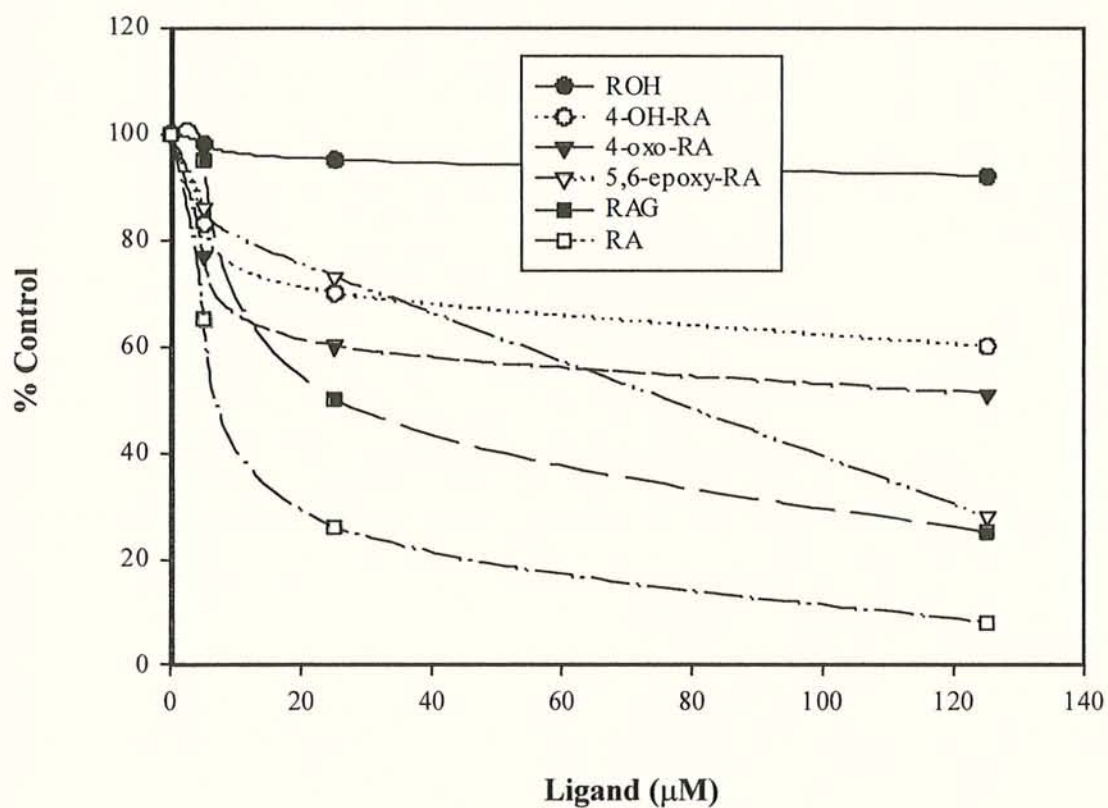


Figure 6. Photoaffinity labeling of CRABP II with [³H]RA and protection by various retinoids

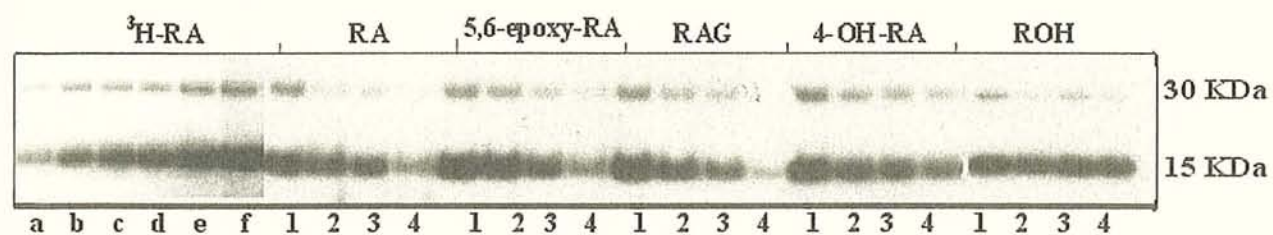


Figure 7. Reactivity of acylglucuronides with UGTs

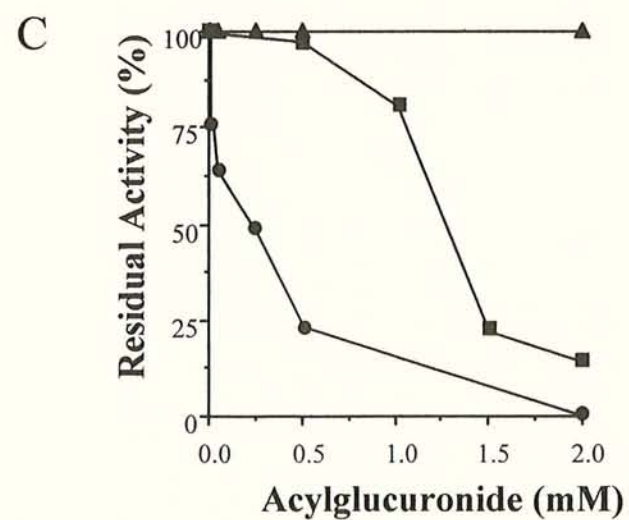
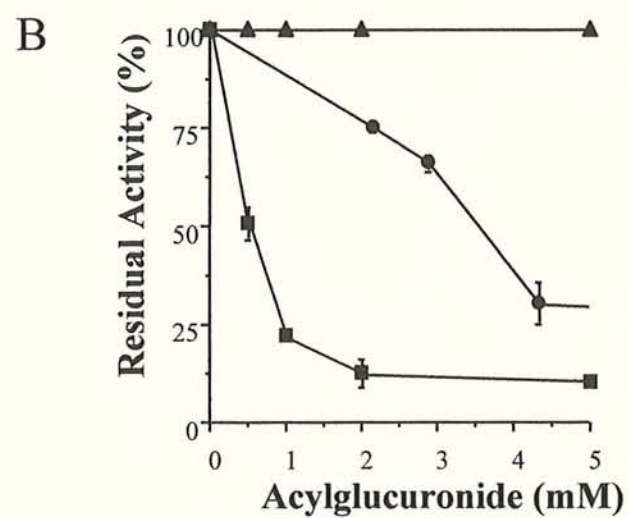
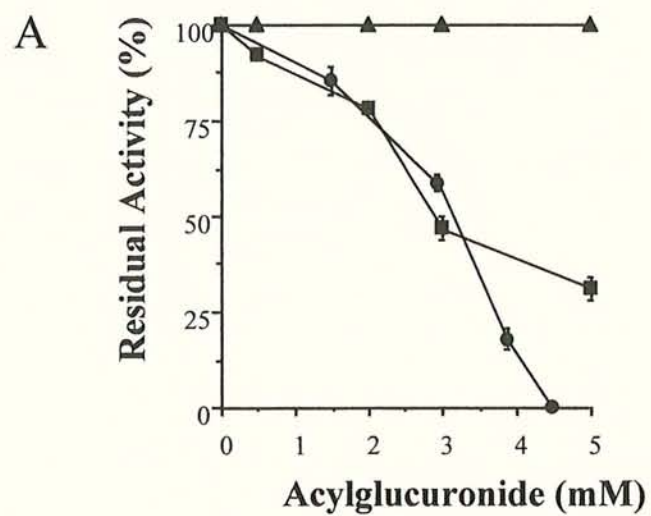


Figure 8. Sequence alignment of human RAR γ , human CRABP I, and rat CRABP II proteins

```

hRAR $\gamma$  206 QLGKYTTNSA DHRVQLDGLWDKFSELATK I I K I V E FAKRLPGFTGLS LA. DQIT L L K A A C L D I I M L R I C T R 278
hCRABP1 66 KVGEGFEEETVDGPKCRSLATWE..NENKIHOTQTLEGDGPKTYWT.RELAND.EL L L T F G A D D V V C T R I Y V R 135
rCRABP2 67 KVGEEFEEQIVDGRPKSLVKAE..SENKMVGEQK L K G E G P K T S W T . R E L T N D G E L L T M T A D D V V C T R V Y V R 136

```

Sequence alignment of human RAR γ , human CRABP I, and rat CRABP II proteins. The alignment shows conserved regions marked by asterisks (*) and gaps marked by dots (..). Vertical lines (|) indicate conserved residues between hCRABP1 and rCRABP2. Diamond symbols (◆) are placed above the hRAR γ sequence at positions 218, 238, 248, 268, and 278.

1.3.2. Interaction des acyl CoA d'acides gras avec les UGT

L'inhibition de la glucuronoconjugaison par les acyl CoA d'acides gras a déjà été rapportée dans la littérature (Krcmery & Zakim, 1993). Cependant, les mécanismes de cette inhibition sont controversés. Notre objectif est d'élucider les mécanismes de la réactivité des acyl CoA vis-à-vis des UGT.

1.3.2.1. Inhibition de la glucuronoconjugaison par les acides gras et leurs dérivés activés acyl CoA

Pour cette étude, trois acides gras sont sélectionnés : un acide gras saturé à courte chaîne, l'acide octanoïque (C8:0), et deux acides gras à longue chaîne représentatifs des acides gras membranaires, l'un saturé, l'acide palmitique (C16:0), et l'autre insaturé, l'acide oléique (C18:1). Leurs acyl CoA correspondants, l'octanoyl CoA, le palmitoyl CoA et l'oléoyl CoA sont également testés. Différentes sources d'UGT sont utilisées : des microsomes hépatiques humains et des fractions membranaires de cellules V79-UGT2B1 et V79-UGT1A6. Trois substrats sont retenus pour la mesure de l'activité enzymatique : le 1-naphtol, substrat pris en charge par l'UGT1A6 et par les microsomes hépatiques humains ainsi que le 2-naphtol et le kétoprofène, substrats pris en charge par l'UGT2B1 et par les microsomes hépatiques humains. Les résultats, rapportés dans le tableau 8, montrent que l'inactivation enzymatique par les acides gras seuls, aux concentrations de 100 μ M et 1 mM, est faible : en effet, exceptée l'inhibition par l'acide octanoïque de la glucuronoconjugaison par l'UGT2B1 du kétoprofène, elle varie de 0 à 20% au maximum. En revanche, l'inactivation par les acyl CoA correspondants est importante, notamment pour des concentrations de 1 mM en acyl CoA pour lesquelles l'inhibition varie généralement de 50 à 100%. L'inactivation semble augmenter avec la longueur de la chaîne de l'acyl CoA ; au contraire, l'insaturation ne semble pas influencer cette inhibition. De plus, la partie CoA, commune à tous les acyl CoA, n'est pas responsable de l'inhibition puisque le CoA seul n'est quasiment pas inhibiteur de la glucuronoconjugaison. Les différentes isoformes d'UGT ne présentent pas la même sensibilité vis-à-vis de l'inhibition par les acyl CoA. Bien que l'UGT2B1 soit l'enzyme impliquée dans la conjugaison des acides gras, leurs dérivés CoA inhibent davantage l'UGT1A6.

Ces résultats montrent que, contrairement aux acides gras et au CoA seul, les acyl CoA (octanoyl CoA, palmitoyl CoA et oléoyl CoA) sont des inhibiteurs de la glucuronoconjugaison catalysée par différentes isoformes d'UGT (UGT1A6 et UGT2B1).

1.3.2.2. Mécanisme de l'inhibition de la glucuronoconjugaison par les acyl CoA : inhibition réversible ou irréversible par acylation ?

Le but de ces expériences est d'identifier le mécanisme de l'inhibition par les acyl CoA. Le palmitoyl CoA a été choisi pour cette étude en raison de son fort pouvoir inhibiteur. Plus particulièrement, dans le but de déterminer si le palmitoyl CoA est capable de se fixer de manière covalente sur les UGT, des microsomes hépatiques humains sont préincubés avec 400 μ M de palmitoyl CoA de 0 à 30 minutes, puis dilués 50 fois pour éliminer l'acyl CoA non fixé de manière

Tableau 8. Effet inhibiteur du CoA, des acides gras et de leurs acyl CoA correspondants, sur la glucuronoconjugaison du 1-naphtol, du 2-naphtol et du kétoprofène, catalysée par des microsomes hépatiques humains et par l'UGT2B1 et l'UGT1A6.

Activité Résiduelle (%)										
Inhibiteurs	Microsomes hépatiques humains				UGT2B1				UGT1A6	
	1-Naphtol		Kétoprofène		2-Naphtol		Kétoprofène		1-Naphtol	
CoA										
100 µM	78 ± 12		100 ± 7		100 ± 2		97 ± 7		99 ± 23	
1 mM	88 ± 12		83 ± 6		100 ± 10		97 ± 9		100 ± 7	
	Acide gras	Acyl CoA	Acide gras	Acyl CoA	Acide gras	Acyl CoA	Acide gras	Acyl CoA	Acide gras	Acyl CoA
C8:0										
100 µM	99 ± 3	71 ± 1	100 ± 3	91 ± 2	85 ± 8	95 ± 6	80 ± 3	100 ± 16	100 ± 3	78 ± 6
1 mM	85 ± 8	21 ± 1	83 ± 0	14 ± 0	88 ± 20	39 ± 1	36 ± 26	95 ± 0	100 ± 1	22 ± 1
C16:0										
100 µM	100 ± 1	38 ± 3	100 ± 0	76 ± 5	89 ± 19	100 ± 7	90 ± 18	100 ± 16	100 ± 5	0
1 mM	100 ± 2	0	94 ± 4	50 ± 2	77 ± 25	4 ± 0	79 ± 19	72 ± 2	100 ± 0	0
C18:1										
100 µM	nd	57 ± 1	nd	97 ± 12	nd	79 ± 2	nd	100 ± 8	nd	0
1 mM	nd	0	nd	19 ± 4	nd	1 ± 0	nd	46 ± 9	nd	0

L'inhibition est réalisée à 25°C, en incubant les microsomes hépatiques humains et les fractions membranaires de cellules V79-UGT2B1 ou V79-UGT1A6 avec le CoA, les acides gras et leurs acyl CoA correspondants (100 µM et 1 mM). L'activité catalytique est évaluée par CLHP couplée à la spectrophotométrie, comme décrit au chapitre *Matériel et Méthodes*. Les aglycones retenus sont le 1-naphtol et le kétoprofène pour les microsomes hépatiques humains, le 2-naphtol et le kétoprofène pour l'UGT2B1, et le 1-naphtol pour l'UGT1A6. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle et correspondent à la moyenne obtenue pour trois essais ± SD. Les activités spécifiques initiales (nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines) en absence d'inhibiteur sont les suivantes : microsomes hépatiques humains, 1-naphtol, 20,5 ± 0,9 et kétoprofène, 2,6 ± 0,2 ; UGT2B1, 2-naphtol, 3,6 ± 0,2 et kétoprofène, 1,3 ± 0,1 ; UGT1A6, 1-naphtol, 29,8 ± 0,8.

C8:0, acide octanoïque ; C16:0, acide palmitique ; C18:1, acide oléique ; nd, non déterminé.

covalente sur les protéines. La mesure de la glucuronoconjugaison du 1-naphtol et du kétoprofène, substrats pris en charge par des isoformes d'UGT différentes, est évaluée. La figure 30 ne montre aucune perte d'activité enzymatique, aussi bien envers le 1-naphtol qu'envers le kétoprofène, en fonction du temps. Ces résultats indiquent que l'inhibition de la glucuronoconjugaison par le palmitoyl CoA semble de type réversible.

Pour mettre en évidence une éventuelle sélectivité de cette inhibition par le palmitoyl CoA vis-à-vis d'une isoforme d'UGT, des microsomes hépatiques humains et des fractions membranaires de cellules V79 exprimant l'UGT2B1 et l'UGT1A6 sont incubés avec des concentrations croissantes en palmitoyl CoA. Les substrats retenus pour la mesure de la glucuronoconjugaison sont le 1-naphtol et le kétoprofène pour les microsomes hépatiques humains, le kétoprofène pour l'UGT2B1 et le 1-naphtol pour l'UGT1A6. Les CI_{50} sont reportées dans le tableau 9. Les CI_{50} de l'activité UGT pour le kétoprofène sont de 3 à 10 fois supérieures aux CI_{50} de l'activité UGT pour le 1-naphtol, ce qui montre une inhibition plus forte des isoformes impliquées dans la conjugaison du 1-naphtol, catalysée préférentiellement par les UGT de la famille 1.

Le mode d'inhibition, présenté sur la figure 31, est de type compétitif. La valeur de K_i (3,1 μM) est presque 20 fois supérieure à la valeur du K_m (57,8 μM), ce qui indique un fort pouvoir inhibiteur de la glucuronoconjugaison du 1-naphtol par le palmitoyl CoA.

L'inhibition de la glucuronoconjugaison par le palmitoyl CoA est puissante, réversible et de type compétitif. Les différentes isoformes d'UGT n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis de cette inhibition. L'UGT1A6 est plus sensible que l'UGT2B1 à l'action du palmitoyl CoA.

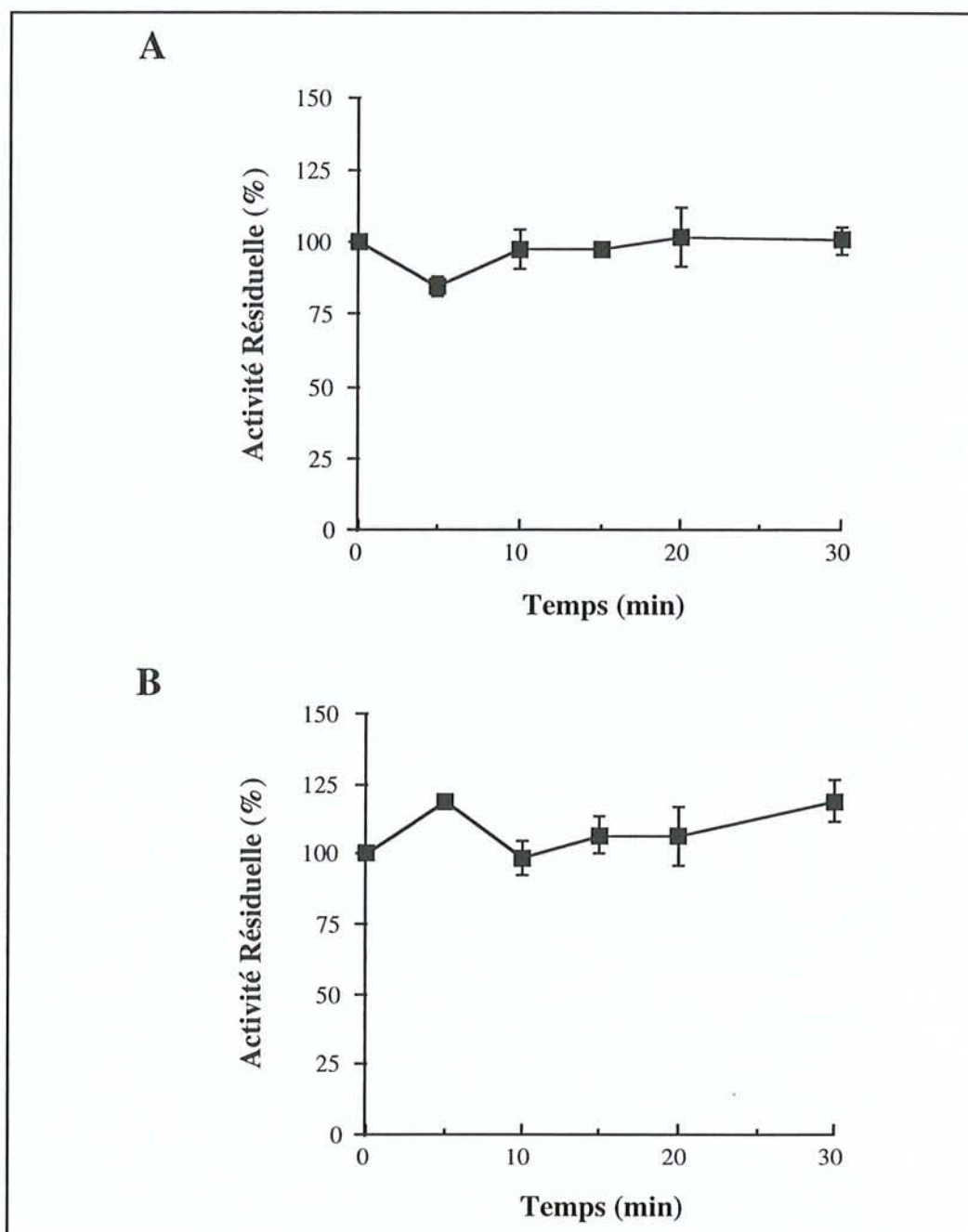


Figure 30. Effet du palmitoyl CoA sur la glucuronoconjugaison catalysée par les microsomes hépatiques humains.

L'expérience est réalisée à 25°C, en incubant les microsomes hépatiques humains avec le palmitoyl CoA (400 μ M). L'inactivation est arrêtée aux temps indiqués et l'activité catalytique est évaluée vis-à-vis du 1-naphtol (A) par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence ou vis-à-vis du kétoprofène (B) par CLHP couplée à la spectrophotométrie, comme décrit au chapitre *Matériel et Méthodes*. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle et correspondent à la moyenne obtenue pour trois essais $\pm$ SD. Les activités spécifiques initiales ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines) en absence d'inhibiteur sont les suivantes : 1-naphtol, $20,5 \pm 0,9$ et kétoprofène, $2,6 \pm 0,2$.

Tableau 9. Inhibition de la glucuronoconjugaison par le palmitoyl CoA. Détermination des CI_{50} .

UGT	CI_{50} (μ M)	
	1-Naphtol	Kétoprofène
Microsomes hépatiques humains	94,0	282,4
UGT2B1		399,3
UGT1A6	33,3	

L'inhibition est réalisée à 25°C, en incubant les microsomes hépatiques humains et les fractions membranaires de cellules V79-UGT2B1 et V79-UGT1A6 avec le palmitoyl CoA (0 à 1,5 mM). L'activité catalytique est évaluée par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence vis-à-vis du 1-naphtol et par CLHP couplée à la spectrophotométrie vis-à-vis du kétoprofène, comme décrit au chapitre *Matériel et Méthodes*. Les aglycones retenus sont le 1-naphtol et le kétoprofène pour les microsomes hépatiques humains, le kétoprofène pour l'UGT2B1 et le 1-naphtol pour l'UGT1A6. Les activités spécifiques initiales ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines) en absence d'inhibiteur sont les suivantes : microsomes hépatiques humains, 1-naphtol, 20,5 et kétoprofène, 2,6 ; UGT2B1, kétoprofène, 1,3 ; UGT1A6, 1-naphtol, 29,8.

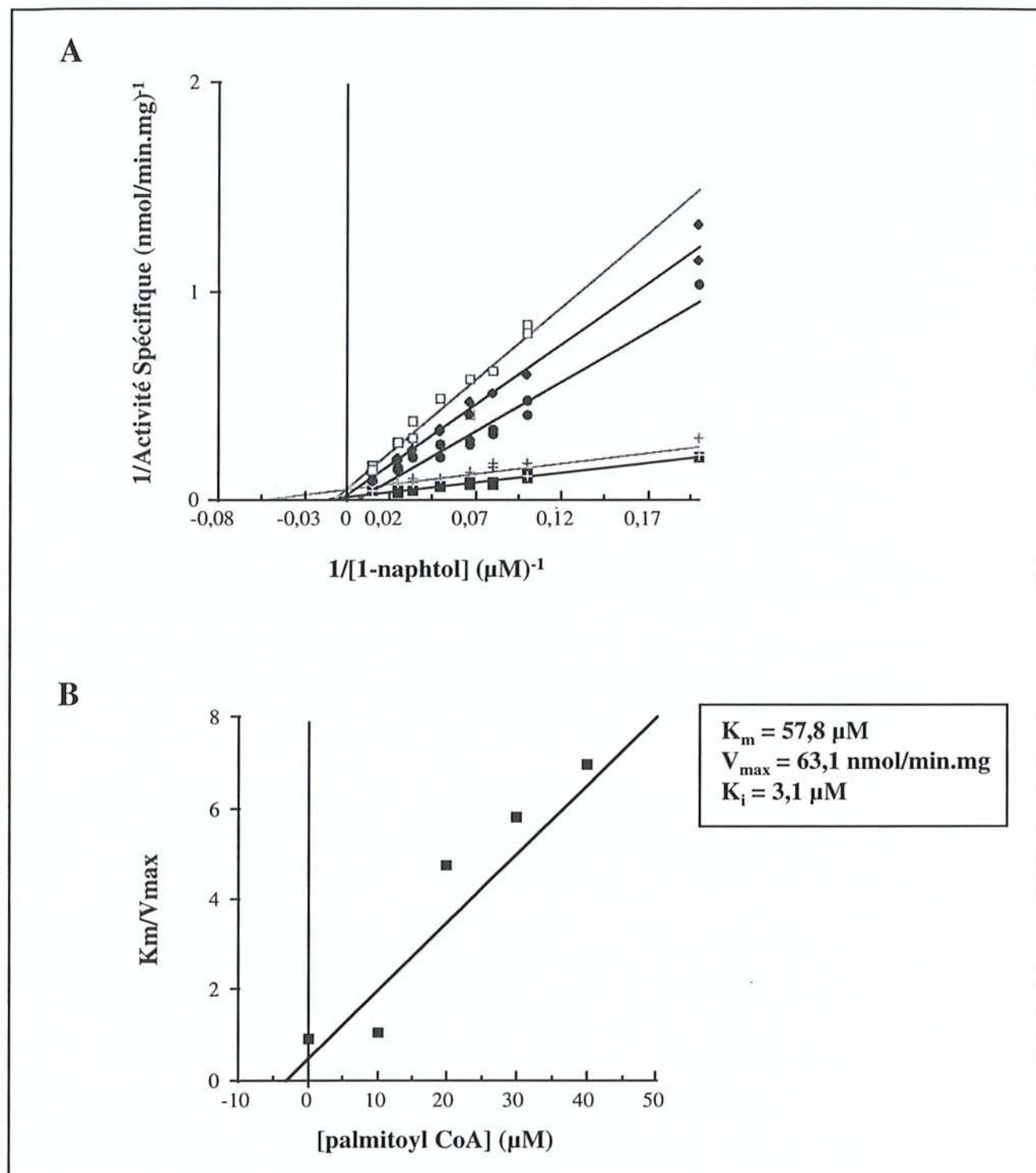


Figure 31. Inhibition par le palmitoyl CoA de la glucuronoconjugaison du 1-naphtol catalysée par l'UGT1A6. Détermination du mode d'inhibition.

A. L'inhibition est réalisée à 25°C, en incubant les fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6 avec le palmitoyl CoA (■, 0 μM ; +, 10 μM ; ●, 20 μM ; ◆, 30 μM et □, 40 μM). L'activité catalytique est évaluée vis-à-vis du 1-naphtol par extraction liquide/liquide couplée à la fluorescence, comme décrit au chapitre *Matériel et Méthodes*.

B. Détermination expérimentale du K_i .

1.4. Recherche d'auto-anticorps dirigés contre les UGT chez des patients atteints d'hépatites virales

Nous avons démontré que les UGT sont des cibles protéiques intracellulaires du glucuronide de kétoprofène. Les adduits ainsi formés pourraient jouer le rôle de néo-antigènes et activer le système immunitaire à l'origine de la formation d'auto-anticorps. Par ailleurs, l'existence d'auto-anticorps dirigés contre les UGT a été décrite chez des patients atteints d'hépatites virales et médicamenteuses (Manns & Obermayer-Straub, 1997). Nous avons démarré un travail en collaboration avec l'équipe du Pr. Jean-Charles Monier (Laboratoire d'Immunologie-Pathologie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite), qui a consisté à rechercher la présence d'anticorps dirigés contre les UGT chez des patients atteints d'hépatites.

Les sérums de 15 patients atteints d'hépatites ont été testés. Une étude préalable a mis en évidence dans ces sérums la présence d'anticorps reconnaissant comme antigènes des protéines membranaires de RE de foie de rat de masses molaires comprises entre 48 et 70 kDa. Les antigènes cibles n'ont pas été identifiés mais possèdent des masses molaires qui pourraient correspondre à celles des UGT. Les sérums de deux patients sains ont également été utilisés et constituent des témoins négatifs. L'ensemble de ces sérums a été testé avec trois types de protéines antigéniques : des microsomes hépatiques humains et des fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6 (isoforme humaine) et V79-UGT2B1 (isoforme de rat) (figure 32). Des protéines hépatiques microsomales humaines, de masses molaires comprises entre 50 et 60 kDa, sont reconnues assez faiblement par des auto-anticorps présents dans le sérum des patients 6, 7, 8, 9, 12 et 13. En revanche, deux protéines à 52 et 58 kDa réagissent très fortement avec des auto-anticorps présents dans le sérum du patient 15 (figure 32A). Ces protéines pourraient être des UGT. Parmi les protéines membranaires de cellules exprimant fortement l'UGT2B1, aucune ayant une masse molaire comprise entre 52 et 56 kDa n'est révélée par des auto-anticorps (figure 32 C). Au contraire, des protéines membranaires à ces masses molaires, issues de cellules exprimant fortement l'UGT1A6, sont reconnues comme antigènes par le sérum des patients 3, 6, 7, 10 et 13, et plus particulièrement le sérum du patient 15 (figure 32B). Aucune protéine antigénique de masse molaire comprise entre 52 et 56 kDa n'a été détectée dans le sérum des patients sains.

Ces résultats préliminaires indiquent que l'UGT1A6, contrairement à l'UGT2B1, pourrait être une protéine antigénique reconnue par le sérum de patients (patients 6, 7 et 15) atteints d'hépatites. Cependant, des études ultérieures, utilisant les UGT purifiées comme protéines antigéniques, doivent être menées pour identifier formellement ces protéines comme des UGT. Des systèmes recombinants performants mis au point au laboratoire, exprimant des quantités importantes d'UGT1A6, tels que les bactéries (*E. coli*) ou les levures (Ouzzine *et al.*, 1999 a et b) pourront être exploités à cette fin.

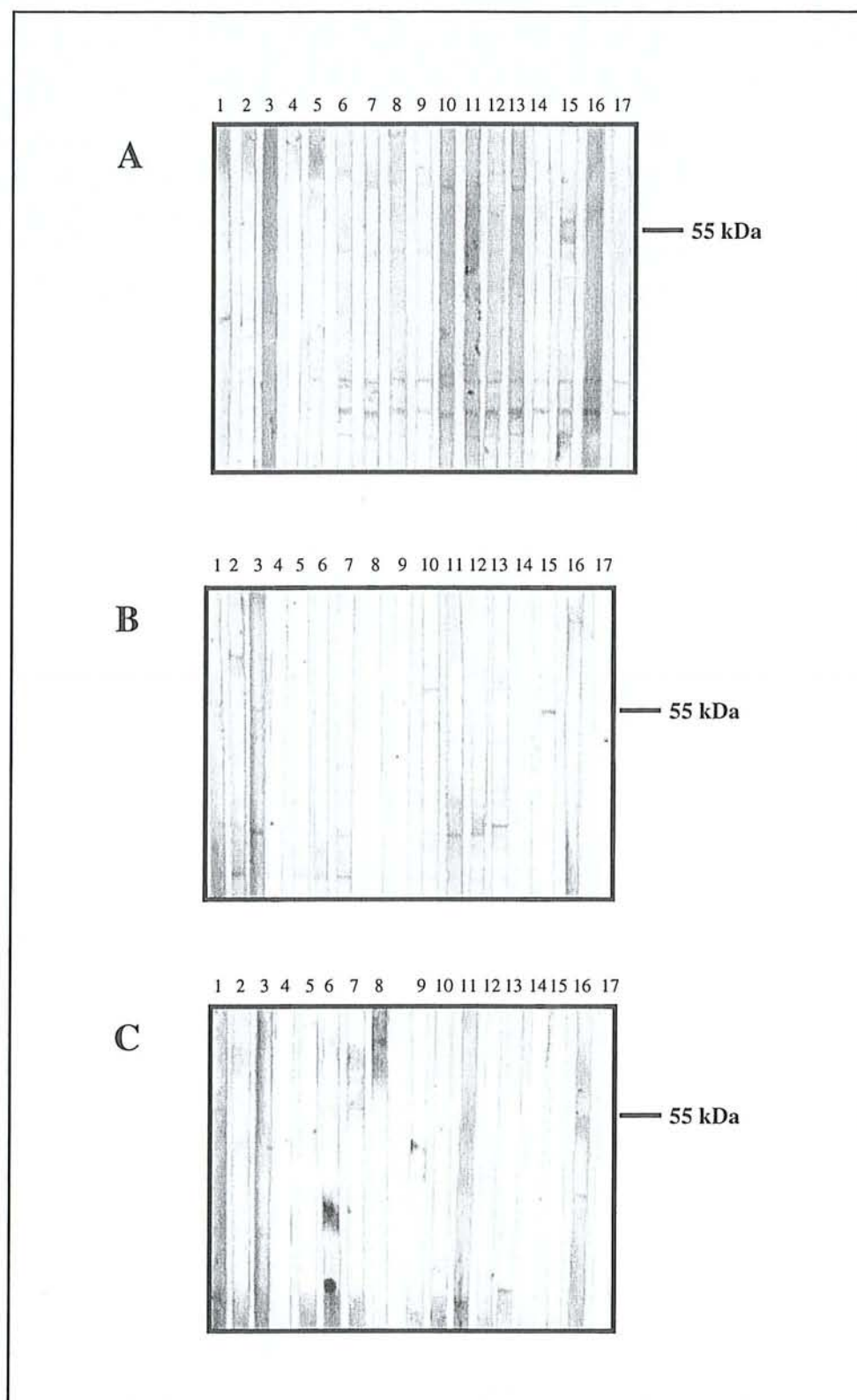


Figure 32. Recherche d'auto-anticorps dirigés contre les UGT.

Les protéines antigéniques (microsomes hépatiques humains (A), fractions membranaires de cellules V79-UGT1A6 (B) et de cellules V79-UGT2B1 (C)) sont séparées sur gel d'électrophorèse et transférées sur une membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée au moyen de 15 sérums de patients atteints d'hépatites (puits 1 à 15) et de 2 sérums de donneurs de sang sains, comme indiqué au chapitre *Matériel et méthodes*.

1.5. Discussion générale

Les glucuronides sont des métabolites généralement stables et inertes dans les conditions physiologiques. C'est le cas des *O*-étherglucuronides, formés par glucuronoconjugaison de composés hydroxylés aromatiques (4MO, 1-naphtol, 2-naphtol, 4-hydroxybiphényle, morphine, codéine, estrogènes) ou aliphatiques (menthol, chloramphénicol, oxazépam). Cependant, d'autres glucuronides, notamment les *O*-acylglucuronides générés à partir des acides carboxyliques (profènes, acide clofibrique, acide valproïque, péfloxacin, probénécide, furosémide, acides biliaires, acide rétinolique tout-*trans*, acides gras), présentent une réactivité particulière et sont potentiellement impliqués dans des phénomènes toxiques.

Les acylglucuronides sont en effet des métabolites électrophiles susceptibles de se lier irréversiblement aux protéines plasmatiques ou tissulaires pour former des adduits. De nombreux travaux ont démontré la réactivité des acylglucuronides, métabolites principaux des médicaments à structure carboxylique issus de multiples classes pharmacologiques (AINS, hypolipémiants, anticonvulsivants, antigoutteux). Des accidents anaphylactiques, rares mais extrêmement graves, ont été décrits à la suite de l'administration de ces médicaments et ont conduit au retrait du marché de certains d'entre eux (ibufénac, zomépirac, bénomaxprofène, piroprofène, suprofène, acide flufenamique). Le kétoprofène, AINS sur lequel s'est essentiellement portée notre étude, est également responsable de réactions allergiques, même si elles sont relativement peu fréquentes (Tardy *et al.*, 1989). Les mécanismes moléculaires de ces réactions n'ont pas été élucidés jusqu'à présent. Cependant, certains effets secondaires indésirables peuvent être expliqués par l'hypothèse des haptènes (Spahn-Langguth & Benet, 1992). En effet, la modification des protéines résultant de la fixation covalente des acylglucuronides pourrait conduire à l'activation du système immunitaire *in vivo*.

De très nombreuses études sur la réactivité des acylglucuronides ont été menées avec l'albumine comme protéine modèle. L'albumine est la protéine la plus abondante dans le plasma humain (60% des protéines plasmatiques). En raison de son rôle de transport de multiples substances endogènes et exogènes, c'est une protéine particulièrement exposée aux métabolites. Enfin, la connaissance de la structure tridimensionnelle de cette protéine déterminée par analyse cristallographique facilite les études mécanistiques de la formation d'adduits (Carter & Ho, 1994).

1.5.1. Mécanismes impliqués dans la formation d'adduits par le glucuronide de kétoprofène

Dans la littérature, les mécanismes impliqués dans la formation d'adduits, substitution nucléophile et base de Schiff (figure 15), ont été essentiellement étudiés avec les protéines plasmatiques (albumine). Le mécanisme par substitution nucléophile aboutit à la fixation irréversible de l'aglycone seul (sans l'acide glucuronique) sur la protéine. Dans le mécanisme de la base de Schiff, qui nécessite préalablement une acylmigration, l'adduit formé retient l'acide glucuronique qui constitue le lien entre la protéine et le médicament.

La nature des mécanismes mis en jeu varie en fonction de l'acylglucuronide considéré. Ding *et al.* (1995) ont montré, par exemple, en utilisant la spectrométrie de masse, que la fixation du glucuronide de tolmétine à l'albumine humaine fait intervenir simultanément les deux mécanismes de substitution nucléophile et de base de Schiff. Par ailleurs, l'étude de la fixation covalente des glucuronides radiomarqués d'oxaprozine à l'albumine humaine a révélé que le mécanisme impliqué est essentiellement une attaque nucléophile (Ruelius *et al.*, 1986). Aussi, la présence de stabilisateurs d'imine (cyanure de sodium ou cyanoborhydruure de sodium) augmente le taux des adduits formés par les glucuronides d'acide 2-phénylpropionique (Greige-Georges, 1999), d'étodolac (Smith *et al.*, 1992) et de zomépirac (Smith *et al.*, 1990) sur l'albumine humaine, suggérant que le mécanisme de fixation impliqué est essentiellement un mécanisme de base de Schiff.

Au laboratoire, des travaux récents ont montré l'existence de trois types d'adduits sur l'albumine humaine avec le glucuronide de kétoprofène. Les deux premiers types d'adduits retiennent la partie aglycone (kétoprofène) du glucuronide, avec ou sans la partie acide glucuronique. Ils représentent les adduits fixés par les deux mécanismes, attaque nucléophile et base de Schiff. Un troisième type d'adduits, qui contient uniquement le motif acide glucuronique, a également été mis en évidence et correspond à la glycation des protéines par l'acide glucuronique. Ainsi, 25 à 50% des molécules d'albumine sont modifiées par fixation covalente de l'acide glucuronique seul. Une lysine localisée dans le site I de la protéine serait impliquée dans la formation des adduits par glycation (Georges *et al.*, 1999b).

Une approche expérimentale complémentaire, basée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse, a été envisagée dans notre groupe afin d'identifier les acides aminés impliqués dans la fixation covalente du glucuronide de kétoprofène sur l'albumine humaine. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'un DEA (Salazar, 1997). Les adduits sont préparés *in vitro* par incubation du 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide de kétoprofène avec l'albumine, en présence de cyanure de sodium. Les protéines adduites sont hydrolysées par la protéase V8 (*Staphylococcus aureus*) à pH 5,0. Les fragments peptidiques obtenus sont séparés par CLHP et analysés simultanément à des longueurs d'onde d'absorption des acides aminés aromatiques (280 nm) et du kétoprofène (256 nm). La spectrométrie de masse en mode electrospray, réalisée sur les pics d'intérêt, permet de déterminer la masse de la partie du glucuronide attachée à la protéine, donc le mécanisme réactionnel ainsi que l'acide aminé impliqué dans la réaction. Les résultats de cette étude ont mis en évidence deux problèmes importants : l'instabilité des adduits lors des étapes d'analyse et le "caractère artificiel" des adduits synthétisés *in vitro*.

1) Les études de la littérature procèdent généralement à une digestion des adduits par la trypsine, active à pH 8,0. Or ces conditions expérimentales (pH alcalin) favorisent la dégradation des adduits. Pour limiter cette hydrolyse, la protéase V8, active à pH 5,0 a été utilisée dans notre étude pour digérer les adduits. Cependant, même dans ces conditions, plus de la moitié des adduits sont hydrolysés avant la première étape analytique. La recherche des acides aminés ne porte alors que sur certains adduits seulement, ceux dont la stabilité est préservée, sans garantie qu'ils constituent un échantillon représentatif.

2) De plus, les adduits ont été synthétisés en présence de stabilisateurs d'imine, de façon encore une fois à éviter leur hydrolyse. Or, le cyanure de sodium est susceptible de déplacer la formation des adduits vers le mécanisme de la base de Schiff. Il semble donc difficile de déterminer ainsi les acides aminés réellement impliqués dans la formation d'adduits dans les conditions physiologiques.

Le manque de sensibilité de cette méthode, lié à l'instabilité des adduits dans nos conditions expérimentales, n'ont pas permis d'identifier les acides aminés impliqués dans la formation des adduits. La mise au point d'autres conditions d'analyse par spectrométrie de masse moins drastiques devrait permettre de limiter l'hydrolyse des adduits et de poursuivre cette stratégie.

De manière complémentaire à ces approches développées précédemment dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés à la réactivité du glucuronide de kétoprofène vis-à-vis de protéines intracellulaires microsomales (microsomes hépatiques, fractions membranaires de cellules recombinantes V79-UGT1A6, V79-UGT2B1 et HK293-UGT2B7). Nous avons montré, au moyen de techniques analytiques (quantification par CLHP des adduits après hydrolyse chimique des protéines microsomales) et immunologiques (Western blot immunorévéle par des anticorps anti-kétoprofène), que l'incubation de glucuronide de kétoprofène avec ces protéines conduit à la formation d'adduits. Nous avons ensuite analysé le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans la fixation covalente de l'acetylglucuronide sur les protéines.

Les expériences de quantification des adduits par CLHP ont été réalisées par incubation des protéines microsomales avec l'isomère 1-*O*-acetyl- β -D-glucuronide seul, pendant des temps courts (30 minutes), sans cyanure de sodium. L'utilisation de ces conditions expérimentales, qui limitent les phénomènes d'acylmigration, suggère que les adduits seraient formés par attaque nucléophile plutôt que par base de Schiff mais n'exclut cependant pas l'existence des deux types d'adduits.

L'influence du cyanure de sodium sur la formation des adduits a ensuite été étudiée. Rappelons que le cyanure de sodium, qui piège les imines, stabilise les adduits formés uniquement par base de Schiff. Les expériences de Western blot, destinées à visualiser les adduits au moyen d'anticorps anti-kétoprofène, ont été réalisées par incubation du 1-*O*-acetyl- β -D-glucuronide de kétoprofène avec les protéines microsomales, pendant des temps longs (4 heures), en présence de cyanure de sodium. Dans notre cas, l'ajout de cyanure de sodium a pour but principal de stabiliser les adduits formés, susceptibles d'être hydrolysés lors des conditions dénaturantes d'électrophorèse et de Western blot. Nous avons détecté l'existence d'adduits par immunorévélation uniquement lorsque le glucuronide de kétoprofène est incubé avec les protéines en présence de cyanure de sodium (résultats non montrés). Ce résultat démontre l'implication du mécanisme de la base de Schiff dans la formation des adduits. L'existence d'un mécanisme par attaque nucléophile n'est pas exclue, mais les adduits formés selon ce mécanisme, qui ne sont pas stabilisés par le cyanure de sodium, sont sans doute hydrolysés au cours des conditions d'électrophorèse et ne peuvent donc pas être détectés.

Nous avons également utilisé une autre approche pour élucider le mécanisme de la formation des adduits. La stratégie consiste à synthétiser et incubé le glucuronide de kétoprofène radiomarké sur l'acide glucuronique avec les protéines microsomales. Les protéines adduites sont séparées sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes et sont soumises à autoradiographie. Comme seul l'acide

glucuronique est radiomarké, les adduits radiodétectés sont forcément des adduits qui ont fixé l'acide glucuronique, c'est-à-dire formés selon un mécanisme de base de Schiff ou par glycation par l'acide glucuronique. Nos expériences ont été réalisées pendant des temps longs (4 heures) et avec du cyanure de sodium de manière à limiter la dégradation des adduits éventuellement formés pendant les conditions dénaturantes de l'électrophorèse. Après un mois d'exposition du gel de séparation des protéines radiomarkées sur un film et malgré la présence de cyanure de sodium, aucun signal n'a pu être détecté. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat. La première serait que les adduits sont formés majoritairement par substitution nucléophile, provoquant la seule fixation du groupement kétoprofène non radiomarké. Cependant, l'implication du mécanisme par base de Schiff dans la formation des adduits ayant été mise en évidence par les approches immunochimiques, une deuxième hypothèse, plus vraisemblable, serait que l'activité spécifique du glucuronide de kétoprofène radiomarké n'est pas suffisamment élevée pour révéler les adduits formés par base de Schiff. En effet, la dilution isotopique du glucuronide de kétoprofène radiomarké liée à sa synthèse et le faible pourcentage d'adduits générés limitent la sensibilité de cette méthode.

Nos résultats indiquent que la fixation covalente du glucuronide de kétoprofène sur les protéines intracellulaires microsomaux s'effectue à la fois *via* les mécanismes attaque nucléophile et formation d'une base de Schiff. Cependant, la contribution relative de chacun des mécanismes reste difficile à établir.

1.5.2. Identification des UGT comme cibles protéiques intracellulaires du glucuronide de kétoprofène

Plusieurs études *in vitro* ont suggéré l'existence de protéines intracellulaires cibles des acylglucuronides. Les adduits sont formés uniquement en présence du médicament sous forme de glucuronide, apporté directement dans le milieu d'incubation.

La formation d'adduits avec ces métabolites est sélective de certains tissus et varie d'un médicament à l'autre. La tolmétine est capable de se lier *in vitro* de manière irréversible à des protéines situées dans le foie, les reins, les poumons ou l'intestin, avec une intensité variable selon l'organe considéré (Ojingwa *et al.*, 1994b). Smith & Liu (1995) ont observé *in vitro* une fixation covalente du suprofène à des protéines rénales et dans une moindre mesure hépatiques. L'ajout d'inhibiteurs d'estérase et de β -glucuronidase augmente le pourcentage de liaison et peut même inverser l'ordre de la réactivité des acylglucuronides vis-à-vis des organes testés. Ce résultat pourrait s'expliquer par la distribution des enzymes hydrolytiques ainsi que par des différences d'affinité vis-à-vis des protéines cibles.

Les protéines exposées en premier lieu à de fortes concentrations en métabolites potentiellement réactifs sont les enzymes responsables de leur formation, notamment les UGT et les P450, principalement exprimées dans le foie. L'incubation de microsomes hépatiques de rat en présence de bénomaxapropène et d'UDPGA conduit à une fixation covalente de l'acylglucuronide sur deux protéines de 43 et 60 kDa (Spahn *et al.*, 1990). Wang et Dickinson (1998) ont constaté la formation d'adduits sur des protéines hépatiques, après perfusion de foie de rat avec du diflunisal, son acylglucuronide ou un mélange de ses isomères de position. Dans les trois cas, deux protéines

modifiées de 110 et 120 kDa ont été reconnues par les anticorps anti-diflunisal. Ces protéines n'ont pas été formellement identifiées. La formation *in vitro* d'adduits hépatiques par le diclofénac a conduit à la mise en évidence de nombreuses protéines membranaires cibles (masses moléculaires de 50 à 200 kDa), localisées dans le RE et dans la membrane plasmique (Kretz-Rommel & Boelsterli, 1994).

Nos travaux ont montré que le glucuronide de kétoprofène se fixe de manière covalente sur des protéines intracellulaires microsomaux pour former des adduits. Différentes approches mises en œuvre ont conduit à identifier les UGT comme cibles protéiques.

La première approche a consisté à purifier les UGT à partir de microsomes hépatiques incubés avec du glucuronide de kétoprofène sur une colonne échangeuse d'ions, selon une méthode décrite par Coffman *et al.* (1996). Les UGT isolées, analysées par Western blot, sont immunorévéloées positivement par les anticorps anti-kétoprofène, indiquant la présence de glucuronide de kétoprofène fixé irréversiblement sur ces protéines. Ce résultat démontre que les UGT sont bien des cibles intracellulaires du glucuronide de kétoprofène. Afin d'obtenir une préparation protéique homogène en vue de l'analyser par séquençage, nous avons réalisé une étape de purification supplémentaire qui a consisté à déposer les UGT précédemment purifiées sur une colonne d'affinité (colonne Blue Sepharose). Nous avons observé que les UGT adduites, contrairement aux UGT natives, ne se fixent pas sur la colonne, indiquant une modification conformationnelle importante des protéines.

La technique de purification des UGT adduites sur colonne échangeuse d'ions montre que les UGT constituent effectivement des protéines cibles du glucuronide de kétoprofène mais ne permet pas d'identifier d'autres protéines microsomaux ayant réagi avec cet acylglucuronide. Or les UGT ne sont certainement pas les seules cibles protéiques. L'analyse par Western blot, au moyen d'anticorps anti-kétoprofène, de microsomes hépatiques incubés avec du glucuronide de kétoprofène, montre l'existence d'un signal immunoréactif particulièrement intense à 56 kDa. Un nombre important de protéines possèdent une masse moléculaire aux environs de 56 kDa. Ce signal pourrait correspondre, outre les UGT, à d'autres protéines microsomaux. Des signaux moins intenses correspondant à des protéines de masses moléculaires apparentes d'environ 43, 48, 50, 52, 55 et 60 kDa) sont également visualisés, confirmant l'existence d'autres cibles du glucuronide de kétoprofène. Des études ultérieures par électrophorèse bidimensionnelle couplée au séquençage devraient permettre d'identifier ces protéines.

Par ailleurs, nous avons tenté de purifier les protéines adduites sur une colonne d'immuno-affinité réalisée avec des anticorps anti-kétoprofène, à partir de microsomes hépatiques incubés avec du glucuronide de kétoprofène. Ce mode de purification présente l'avantage d'isoler l'ensemble des protéines adduites, et pas uniquement les UGT. Les fractions protéiques éluées de la colonne d'immuno-affinité sont analysées par Western blot, au moyen d'anticorps anti-UGT, afin de déterminer si les UGT font partie des protéines cibles (résultats non montrés). Nous n'avons pas été en mesure de purifier les UGT adduites au moyen de cette méthode. Cependant, si le glucuronide se fixe sur un site localisé au cœur de la protéine, les adduits formés intrinsèquement ne peuvent pas se fixer aux anticorps anti-kétoprofène de la colonne et seuls les adduits formés à l'extérieur de la protéine peuvent ainsi être purifiés. Ainsi, comme nous avons démontré que les UGT sont effectivement des cibles protéiques du glucuronide de kétoprofène, l'hypothèse de la fixation du

métabolite à l'intérieur de la protéine pourrait expliquer l'impossibilité de purifier les adduits par immuno-affinité.

Nous avons également essayé d'identifier l'(es) isoforme(s) en cause par séquençage des UGT adduites purifiées sur colonne échangeuse d'ions. Nous n'avons pas été en mesure de déterminer la séquence de l'isoforme cible pour des raisons expérimentales propres au séquençage. En effet, la protéine semble être bloquée en position *N*-terminale, empêchant la première étape du séquençage par dégradation d'Edman. De plus, les faibles quantités de protéines adduites purifiées ne nous ont pas permis de mettre en œuvre d'autres méthodes de séquençage spécifiques à des protéines bloquées en position *N*-terminale (hydrolyse partielle des protéines avant séquençage).

1.5.3. Identification du site de fixation du glucuronide de kétoprofène sur les UGT

La purification des UGT adduites sur colonne échangeuse d'ions a permis l'identification des UGT comme cibles protéiques intracellulaires du glucuronide de kétoprofène. Afin de déterminer le site de fixation du glucuronide de kétoprofène sur les UGT, nous avons mis en œuvre une technique de marquage de photo-affinité au moyen d'une sonde photo-activable analogue de l'UDPGA. Nous avons montré que le glucuronide de kétoprofène inhibe la photo-incorporation de la sonde radiomarkée [β - 32 P]5N₃UDPGA sur les UGT. Ce résultat indique que le glucuronide de kétoprofène entre en compétition avec la sonde pour le même site de fixation, en l'occurrence le site de l'UDPGA. Ainsi, l'hypothèse émise en faveur de la fixation de l'acylglucuronide sur un site localisé au sein de la protéine se confirme.

Nous avons également montré que le glucuronide d'acide lithocholique inhibe la photo-incorporation de la sonde [β - 32 P]5N₃UDPGA sur l'UGT2B7, indiquant que l'acide lithocholique se fixe également dans le site de l'UDPGA. Cette interaction serait à l'origine de l'inhibition de la glucuronoconjugaison. Tous les glucuronides (*O*-, *S*- et *N*-glucuronides) ont en commun le motif acide glucuronique, susceptible d'interagir avec le site de fixation de l'UDPGA par analogie structurale. Les acylglucuronides peuvent de plus se lier de manière covalente à des acides aminés nucléophiles des protéines. Ces deux propriétés pourraient expliquer la capacité des acylglucuronides à se fixer irréversiblement dans le site de l'UDPGA. Ainsi, tout acylglucuronide serait alors susceptible de former un adduit au sein du site de l'UDPGA. Or nous n'avons pas observé de fixation covalente du glucuronide d'acide rétinolique tout-*trans* sur les protéines microsomales *in vitro*.

En fait, la structure chimique de l'aglycone nous semble un paramètre particulièrement important. La différence de réactivité observée pour les diastéréoisomères ou les isomères de position d'un même acylglucuronide illustre la complexité de ces phénomènes. Au laboratoire, Dubois *et al.* (1993) ont montré que la fixation covalente des diastéréoisomères *R* et *S* du glucuronide de kétoprofène sur l'albumine humaine est stéréosélective en faveur de l'énantiomère *S*. Au contraire, les glucuronides de l'énantiomère *R* du carprofène (Georges *et al.*, 1999c), du fénoprofène (Volland *et al.*, 1991) et du naproxène (Bischer *et al.*, 1995), forment des taux d'adduits à l'albumine humaine supérieurs au diastéréoisomère *S*. Les isomères de position 2-, 3-, 4-*O*-acyl- β -D-glucuronides de

carprofène (Georges *et al.*, 1999c), de diflunisal (Williams & Dickinson, 1994) et d'acide valproïque (Williams *et al.*, 1992) sont plus réactifs vis-à-vis de l'albumine humaine que le 1-*O*-acyl- β -D-glucuronide.

La comparaison des structures chimiques du kétoprofène, de l'acide lithocholique et de l'acide rétinoïque tout-*trans*, représentées sur la figure 33, pourrait expliquer les différences de réactivité vis-à-vis des protéines microsomales observées pour les acylglucuronides correspondants. Les deux groupements phényles du kétoprofène sont susceptibles d'interagir, par le biais de liaisons hydrophobes, avec des groupements aromatiques d'acides aminés de la protéine (tyrosine, phényl alanine, tryptophane), stabilisant ainsi le glucuronide sur des sites déterminés de la protéine. De même, le caractère encombré de l'acide lithocholique contraint l'acylglucuronide dans une conformation rigide au sein de la protéine, pouvant favoriser sa fixation sur un site peptidique donné. Au contraire, la flexibilité de la chaîne hydrophobe de l'acide rétinoïque tout-*trans* pourrait être à l'origine d'une certaine mobilité de l'acylglucuronide au niveau de la protéine, limitant ainsi sa spécificité d'interaction et son accessibilité pour une attaque nucléophile par un acide aminé.

1.5.4. Investigation des acides aminés impliqués dans la fixation covalente du glucuronide de kétoprofène sur les UGT

Dans la littérature, les expériences de modification chimique de l'albumine ont permis de caractériser le(s) acide(s) aminé(s) impliqué(s) dans la liaison covalente des acylglucuronides à la protéine et l'utilisation de marqueurs de sites connus de l'albumine ont donné des indications sur le(s) site(s) atteint(s). Ainsi, des travaux réalisés dans notre équipe indiquent que le diastéréoisomère *R* du glucuronide de kétoprofène réagirait avec des acides aminés lysine et/ou tyrosine, localisés dans le site II de l'albumine, selon un mécanisme d'attaque nucléophile. La formation d'adduits par le diastéréoisomère *S* du métabolite se produirait dans le site I, *via* un mécanisme de base de Schiff (Presle *et al.*, 1996).

Nos résultats suggèrent que le glucuronide de kétoprofène forme des adduits avec les UGT à la fois *via* les mécanismes d'attaque nucléophile et de base de Schiff. Les groupements nucléophiles impliqués dans le mécanisme par substitution nucléophile seraient les fonctions SH des cystéines (Van Breemen & Fenselau, 1985), OH des tyrosines ou des sérines (Ruelius *et al.*, 1986), et NH₂ des lysines (Van Breemen & Fenselau, 1985), alors que ceux à l'origine du mécanisme par base de Schiff seraient essentiellement les fonctions amines (NH₂ des lysines ou extrémité *N*-terminale des protéines) (Smith *et al.*, 1990). De plus, nous savons que le glucuronide de kétoprofène interagit avec le site de fixation de l'UDPGA, commun à toutes les isoformes d'UGT. La partie conservée C-terminale de toutes les UGT présente une séquence consensus FhTHGGxxShxExhxxGVPhhxxPhxxDQ, où h est un acide aminé hydrophobe et x un acide aminé non spécifique (Mackenzie *et al.*, 1997). Cette séquence comporte une sérine, acide aminé potentiellement impliqué dans la formation d'adduits par attaque nucléophile, mais pas de lysine, qui est l'acide aminé plutôt à l'origine du mécanisme par base de Schiff. Par ailleurs, l'alignement des séquences primaires des UGT présente deux cystéines fortement conservées (100%), la cystéine C126, localisée dans la partie *N*-terminale (site de fixation

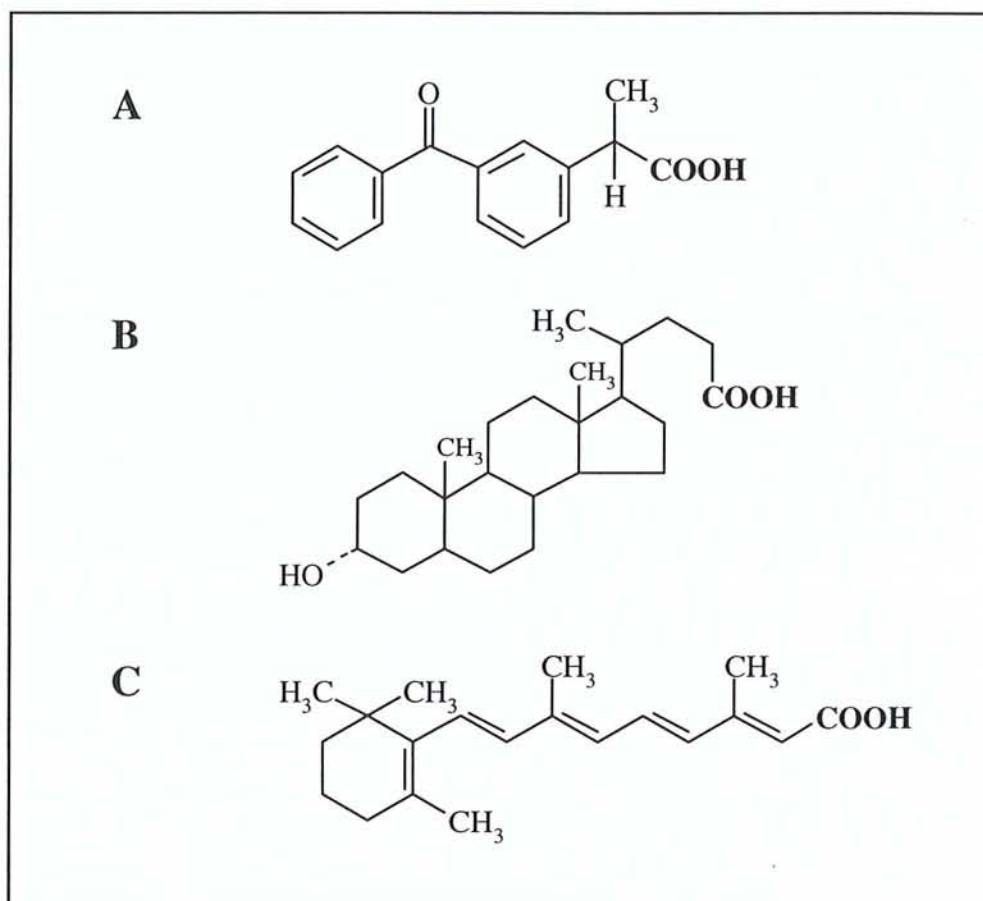


Figure 33. Structure chimique du kétoprofène (A), de l'acide lithocholique (B) et de l'acide rétinoïque tout-trans (C).

des aglycones) et la cystéine C277, située dans la région C-terminale (site de fixation de l'UDPGA). Nous montrerons que l'UGT1A6 humaine est inactivée par les maléimides, les agents de modification chimique spécifiques des cystéines. Ainsi, si les cystéines peuvent être modifiées par réaction covalente avec les maléimides, d'autres composés électrophiles, comme le glucuronide de kétoprofène, peuvent également réagir avec ces cystéines qui peuvent être des acides aminés impliqués dans le mécanisme de formation d'adduits par attaque nucléophile. La formation d'adduits pourrait alors être due à la réactivité du glucuronide de kétoprofène avec la cystéine de la partie conservée C-terminale (C277), dans laquelle est localisé le site de fixation de l'UDPGA, selon un mécanisme de formation d'adduits de type attaque nucléophile. Des expériences de mutagenèse dirigée permettront de confirmer ou non cette hypothèse.

1.5.5. Analyse des cinétiques d'inhibition par les métabolites d'acides carboxyliques

Nous avons montré que le glucuronide de kétoprofène est responsable de l'inhibition de la glucuronoconjugaison catalysée par différentes isoformes d'UGT *in vitro*. L'inhibition observée est fortement corrélée à la formation d'adduits avec les protéines microsomales. De plus, elle est dépendante de la concentration en glucuronide et du temps d'inactivation, ce qui indique que la nature de l'inhibition est de type irréversible.

Nos résultats montrent que le glucuronide de kétoprofène inhibe la glucuronoconjugaison catalysée par l'UGT2B1 ou par l'UGT2B7, les isoformes impliquées dans le métabolisme des acides carboxyliques, mais également la glucuronoconjugaison catalysée par l'UGT1A6, une isoforme dont les substrats préférentiels ne sont pas des acides carboxyliques mais tout de même impliquée dans la conjugaison de certains AINS comme le S-naproxène (Ebner & Burchell, 1993). L'interaction du glucuronide de kétoprofène avec le site de fixation de l'UDPGA, commun à toutes les isoformes d'UGT, permettrait d'expliquer l'inhibition de la glucuronoconjugaison de différentes isoformes.

La cinétique d'inactivation des UGT par le glucuronide de kétoprofène est biphasique : la première phase d'inactivation est courte et peu importante alors que la seconde phase est plus conséquente. L'implication de mécanismes simultanés peut être à l'origine de ce type de cinétiques. En effet, les adduits peuvent être formés par attaque nucléophile ou/et par base de Schiff avec des cinétiques différentes et ainsi inhiber la glucuronoconjugaison avec des cinétiques mixtes.

Dans la littérature, des cinétiques complexes de formation d'adduits ont été rapportées. La cinétique de formation des adduits aux protéines peut être lente ou immédiate, stable ou évoluer dans le temps. Les taux d'adduits à l'albumine humaine à partir du glucuronide de kétoprofène (Presle *et al.*, 1996) et de zomépirac (Smith *et al.*, 1986) augmentent en fonction du temps. Par ailleurs, la fixation covalente à l'albumine bovine des glucuronides d'acide flufénamique est instantanée et augmente en fonction du temps alors que la fixation des métabolites du carprofène à l'albumine humaine est immédiate mais reste stable (Georges *et al.*, 1999c).

Des cinétiques mixtes sont également observées avec le kétoprofényle CoA. Bien que l'inhibition de la glucuroconjugaison par le kétoprofényle CoA soit plus faible que celle observée pour le glucuronide de kétoprofène, elle suit également deux phases (figure 27). La première phase d'inactivation est rapide (de 0 à 2 minutes) et importante alors que la deuxième phase est beaucoup plus lente et n'atteint pas des taux d'inhibition supérieurs à 50%. Ce type d'inhibition complexe peut s'expliquer par l'intervention de deux mécanismes : une inhibition réversible par interaction du kétoprofényle CoA avec le site de fixation du kétoprofène, ou une acylation de la protéine par fixation covalente du kétoprofényle CoA sur les protéines. Par ailleurs, les thioesters de CoA sont susceptibles, par leurs propriétés détergentes, de perturber l'organisation des membranes biologiques (Fears *et al.*, 1978). Ainsi, l'incorporation du kétoprofényle CoA dans la membrane du RE, en désorganisant la structure des protéines membranaires, en l'occurrence celle des UGT dont l'activité catalytique est strictement phospholipidodépendante, pourrait également expliquer la phase d'inactivation plus lente de la glucuroconjugaison.

En ce qui concerne l'inactivation par les acyl CoA dérivés des acides gras, le palmitoyl CoA semble inhiber la glucuroconjugaison de manière réversible, selon un mode d'inhibition compétitif. Or l'équipe de Yamashita *et al.* (1995) a montré *in vitro* que l'inhibition de la glucuroconjugaison par les acyl CoA d'acides gras est principalement due à la formation d'une liaison covalente entre l'acyl CoA et les UGT. Cependant, nous pouvons considérer que le palmitoyl CoA peut être également responsable d'une acylation de la protéine mais, dans notre cas, sans conséquence en terme d'inhibition de la glucuroconjugaison. Les travaux de Krcmery & Zakim (1993) ont permis par ailleurs de montrer que l'oléoyl CoA, utilisé à des concentrations physiologiques dans le foie, inhibe la glucuroconjugaison du 1-naphtol et du 4-nitrophénol catalysée par des microsomes hépatiques. Le mécanisme de cette inhibition impliquerait un changement de l'état natif de l'enzyme par l'oléoyl CoA en un état modifié qui présenterait une activité catalytique réduite.

1.5.6. Formation d'adduits *in vitro/in situ/in vivo*

Nous avons montré que le glucuronide de kétoprofène forme des adduits *in vitro*. Les quantités d'adduits produites peuvent paraître relativement faibles (de 0,03 à 0,25 nmoles de kétoprofène par milligramme de protéines microsomales) mais ont cependant été montrées suffisantes pour inhiber la glucuroconjugaison. De plus, seuls les adduits les plus stables sont mis en évidence par des techniques immunologiques, sous-estimant ainsi le taux d'adduits réellement générés. Par ailleurs, les concentrations en glucuronide de kétoprofène utilisées *in vitro* pour inhiber la glucuroconjugaison sont relativement importantes, de l'ordre de 1 à 5 mM. Cependant, les concentrations intracellulaires en glucuronides au sein du site même de leur formation *in vivo* sont probablement suffisamment importantes pour engendrer la formation d'adduits.

Dans le but de vérifier que la glucuroconjugaison du kétoprofène génère une concentration suffisante en acylglucuronide pour produire des adduits, nous avons développé un système d'étude *in situ*, dans lequel le glucuronide de kétoprofène est directement biosynthétisé par des cellules en culture exprimant l'isoforme d'UGT responsable de sa formation (UGT2B1). Nos résultats montrent que les

cellules en culture transfectées par l'UGT2B1 sont à l'origine de la synthèse de glucuronide de kétoprofène en concentration suffisante pour être à l'origine de la formation d'adduits (quantifiés par des méthodes analytiques et visualisés par immunofluorescence) et d'une inhibition d'environ 35% de la glucuronoconjugaison du 2-naphtol *in situ* catalysée par ces mêmes cellules. Pour évaluer la signification et les conséquences pharmacologiques et toxicologiques de cette réactivité *in vivo*, nous pensons qu'il serait judicieux d'étendre cette étude à des systèmes plus physiologiques comme les hépatocytes. Le kétoprofène serait directement ajouté dans le milieu de culture des hépatocytes et la glucuronoconjugaison par ces systèmes enzymatiques ainsi que la formation d'adduits intracellulaires seraient évaluées au moyen des techniques déjà utilisées pour les systèmes cellulaires *in situ*.

De nombreuses études, réalisées *in vivo* chez l'homme et l'animal, ont révélé l'existence d'adduits plasmatiques. Par exemple, Williams *et al.* (1995) ont mis en évidence dans le plasma de rats traités au diflunisal, une seule protéine adduite de 60 kDa, qui correspond probablement à l'albumine. Après administration de zomépirac, de diflunisal, d'acide valproïque ou d'acide clofibrigue à des rats, un adduit de masse moléculaire de 70 kDa a été révélé par Western blot dans le plasma des rats (Bailey & Dickinson, 1996). La reconnaissance de cet adduit par un anticorps anti-albumine confirme qu'il s'agit de l'albumine.

Les organes de synthèse (foie, reins) ou d'élimination (foie, intestin, reins) des acylglucuronides, exposés *in vivo* à de fortes concentrations de métabolites, sont susceptibles d'être les organes cibles de la formation d'adduits aux protéines tissulaires. La formation d'adduits de diflunisal a été étudiée *in vivo* chez le rat. Les plus fortes concentrations d'adduits sont trouvées dans la vessie et le foie mais des adduits sont également détectés dans les reins, le plasma, l'intestin grêle et les muscles squelettiques (Dickinson & King, 1993 ; King & Dickinson, 1993).

Le diclofénac est à l'origine de la formation d'adduits *in vivo* chez le rat. Les métabolites du diclofénac, non seulement les acylglucuronides mais également les métabolites hydroxylés, semblent impliqués dans la formation de ces adduits. Des protéines hépatiques membranaires, localisées dans le RE (50 kDa) et dans la membrane plasmique (110, 140 et 200 kDa) sont cibles des métabolites du diclofénac (Hargus *et al.*, 1994 ; Shen *et al.*, 1997). Certaines de ces protéines ont été identifiées. Hargus *et al.* (1994) ont montré dans des microsomes hépatiques de rat qu'un P450 catalyse l'apparition des adduits de 51 kDa. Par la suite, Shen *et al.* (1997) ont pu identifier cette protéine modifiée : il s'agit du P450 2C11, une isoforme exprimée uniquement chez le rat mâle. Le mécanisme impliqué est l'oxydation du diclofénac par cette enzyme en un métabolite hydroxylé très réactif. Ce métabolite, dès sa formation, se fixe irréversiblement sur l'enzyme et provoque son inactivation. Des métabolites électrophiles autres que les acylglucuronides sont donc également réactifs et peuvent être à l'origine de réactions toxiques. Le P450 2C9 est l'isoforme principale impliquée dans le métabolisme du diclofénac chez l'homme. Cette isoforme présente 85% d'homologie avec le P450 2C11. Ainsi, un mécanisme analogue à la formation d'adduits sur le P450 2C11 pourrait se produire avec le P450 2C9 et expliquer ainsi l'hépatotoxicité observée chez l'homme lors de l'administration de diclofénac. Shen *et al.* (1999) ont démontré que le P450 2C9, qui catalyse la synthèse du 4'-hydroxy-diclofénac, n'est pas responsable de la formation d'adduits sur des microsomes hépatiques humains. Au contraire, le P450 3A4, responsable de la formation du 5-hydroxy-diclofénac, semble impliqué dans le mécanisme

de la formation des adduits. En fait, un dérivé *p*-benzoquinone imine, synthétisé à partir du 5-hydroxy-diclofénac en absence de glutathion et de NADPH, est le métabolite réactif qui se fixe de manière covalente aux microsomes hépatiques humains.

1.5.7. Conséquences de la formation d'adduits sur les UGT

Nos résultats démontrent que les UGT sont des cibles protéiques intracellulaires de la fixation covalente de métabolites d'acides carboxyliques *in vitro* et *in situ*. Différents métabolites sont responsables de la formation de ces adduits : les acylglucuronides, générés par glucuronoconjugaison d'acides carboxyliques (kétoprofène et acide lithocholique) et les acyl CoA (kétoprofényle CoA), formés par inversion chirale des profènes. La formation de ces adduits peut être à l'origine de deux types de conséquences : l'une est directement liée à la modification de la structure et de la fonction des protéines cibles et l'autre pourrait être médiée par le système immunitaire.

Nous avons montré que la formation des adduits par le glucuronide de kétoprofène est corrélée à l'inhibition de la glucuronoconjugaison catalysée par différentes isoformes (UGT1A6, UGT2B1, UGT2B7) à la fois *in vitro* mais également *in situ*. De plus, la glucuronoconjugaison est également inhibée par auto-acylation de la protéine par des acyl CoA d'acides gras (Yamashita *et al.*, 1995). Ainsi, la formation des adduits pourrait *in vivo* être à l'origine d'une modification du métabolisme de médicaments et de substances endogènes. Cependant, l'impact de ces conséquences directes *in vivo* dépend certainement de la demi-vie des adduits dont l'élimination est fortement liée au turn-over de la protéine cible. L'existence d'une prise en charge de la glucuronoconjugaison par d'autres UGT non touchées par la formation d'adduits contribue sans doute à minimiser ses conséquences en terme de métabolisme.

L'intervention de la formation d'adduits dans le déclenchement de réactions immuno-allergiques reste à démontrer. Cependant, la présence d'auto-anticorps dirigés contre les UGT (anticorps anti-LKM₃) a été décrite chez des patients atteints d'hépatites auto-immunes ou virales. Plusieurs épitopes conformationnels semblent être reconnus par les anticorps anti-LKM₃. Les UGT de la famille 1, notamment les UGT1A1, 1A4 et 1A6 ont été révélées comme les cibles antigéniques majeures d'anticorps anti-LKM₃ détectés chez des patients porteurs du virus de l'hépatite D. Ces isoformes possèdent des domaines *N*-terminaux différents mais des domaines *C*-terminaux identiques. Ainsi, l'épitope majoritaire reconnu par les anticorps anti-LKM₃ serait situé sur la partie *C*-terminale des UGT de la famille 1, entre les acides aminés 264 et 373. Par ailleurs, un autre épitope a également été localisé dans la partie *N*-terminale. Enfin, un troisième épitope, minoritaire, a également été trouvé sur des isoformes de la famille 2 (UGT2B13, UGT2B14, UGT2C1) (Philipp *et al.*, 1994 ; Manns & Obermayer-Straub, 1997). Les mécanismes intervenant dans le déclenchement de ces réactions auto-immunes par infection virale n'est cependant pas connu à ce jour. Ainsi, la question soulevée par notre travail est de savoir quelles peuvent être les conséquences *in vivo* de la formation d'adduits avec les UGT, notamment si les protéines adduites peuvent être à l'origine de la formation d'auto-anticorps. Nous avons à ce propos commencé un travail qui consiste à rechercher la présence d'auto-anticorps dirigés contre les UGT chez des patients atteints d'hépatites. Les résultats préliminaires de cette étude semblent indiquer que les UGT, notamment l'UGT1A6, pourrait être une

cible antigénique de la formation d'auto-anticorps. Après confirmation de ces résultats, il serait intéressant d'essayer d'établir un lien éventuel entre la présence de ces anticorps et des traitements thérapeutiques de ces patients aux AINS.

II. Etude de la structure et de la fonction des UGT impliquées dans la formation d'acylglucuronides

II.1. Clonage et expression stable de l'UGT2B7 dans les cellules V79

Pour étudier et comprendre la réactivité des acylglucuronides, il est important d'identifier et de caractériser les isoformes d'UGT impliquées dans la formation de ces métabolites. Chez le rat, il a été précédemment montré dans notre laboratoire que l'UGT2B1 est l'isoforme majoritairement responsable de la glucuronoconjugaison des AINS. L'UGT2B7 a été récemment identifiée comme l'isoforme humaine qui présente une spécificité vis-à-vis de composés possédant une structure acide carboxylique.

II.1.1. Résultats

Nous nous sommes intéressés à l'implication de l'UGT2B7 dans la glucuronoconjugaison des AINS et d'autres substrats carboxyliques (hormones stéroïdiennes, acide rétinoïque, acides biliaires).

La séquence de l'UGT2B7 (Ritter *et al.*, 1990) a été amplifiée par "polymerase chain reaction" à partir d'une banque de foie humain au moyen d'amorces oligonucléotidiques appropriées puis sous-clonée dans le vecteur pcDNA1.1. Le clonage de cet ADNc a été réalisé au laboratoire en collaboration avec le Dr. Mohamed Ouzzine. Nous l'avons exprimé de façon stable dans les cellules V79 en culture. Une lignée exprimant l'UGT2B7 sous forme catalytiquement active a été isolée et amplifiée (figure 34B).

Le tableau 10 présente l'analyse de la spécificité de substrat vis-à-vis de molécules de structures variées. L'UGT2B7 est responsable de la glucuronoconjugaison d'acides carboxyliques tels les AINS (kétoprofène) ou certaines hormones (androstérone, épitestostérone, β -estradiol) avec des activités spécifiques du même ordre de grandeur (10 à 30 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines). L'UGT2B7 est également capable de métaboliser l'acide hyodéoxycholique avec une activité spécifique de l'ordre de 75 pmol/min.mg. La glucuronoconjugaison de substrats phénoliques plans (4MO, 1- et 2-naphtol), a également été évaluée dans les mêmes conditions. Les activités spécifiques mesurées sont élevées comparées à celles des substrats carboxyliques (jusqu'à 20 fois plus, résultats non montrés). Cependant, il existe une activité catalytique endogène, propre aux cellules V79, vis-à-vis des substrats phénoliques (figure 34A), qui a également été observée par d'autres équipes (cellules COS, Jin *et al.*, 1993 ; cellules V79, Pritchard *et al.*, 1994). Il est intéressant de remarquer que les cellules V79 non transfectées ne métabolisent pas l'androstérone alors que l'UGT2B7 présente une activité importante envers ce substrat (figure 34).

L'isoforme UGT2B7 humaine a été clonée et exprimée de façon stable dans les cellules V79. Cette isoforme est catalytiquement active vis-à-vis notamment de substrats carboxyliques.

II.1.2. Comparaison de la spécificité de substrat des UGT2B7 et UGT2B1

L'UGT2B7 a été précédemment clonée et exprimée dans les cellules COS et HK293. Deux variants ont été identifiés : l'un avec un acide aminé tyrosine en position 268 (UGT2B7Y) et l'autre

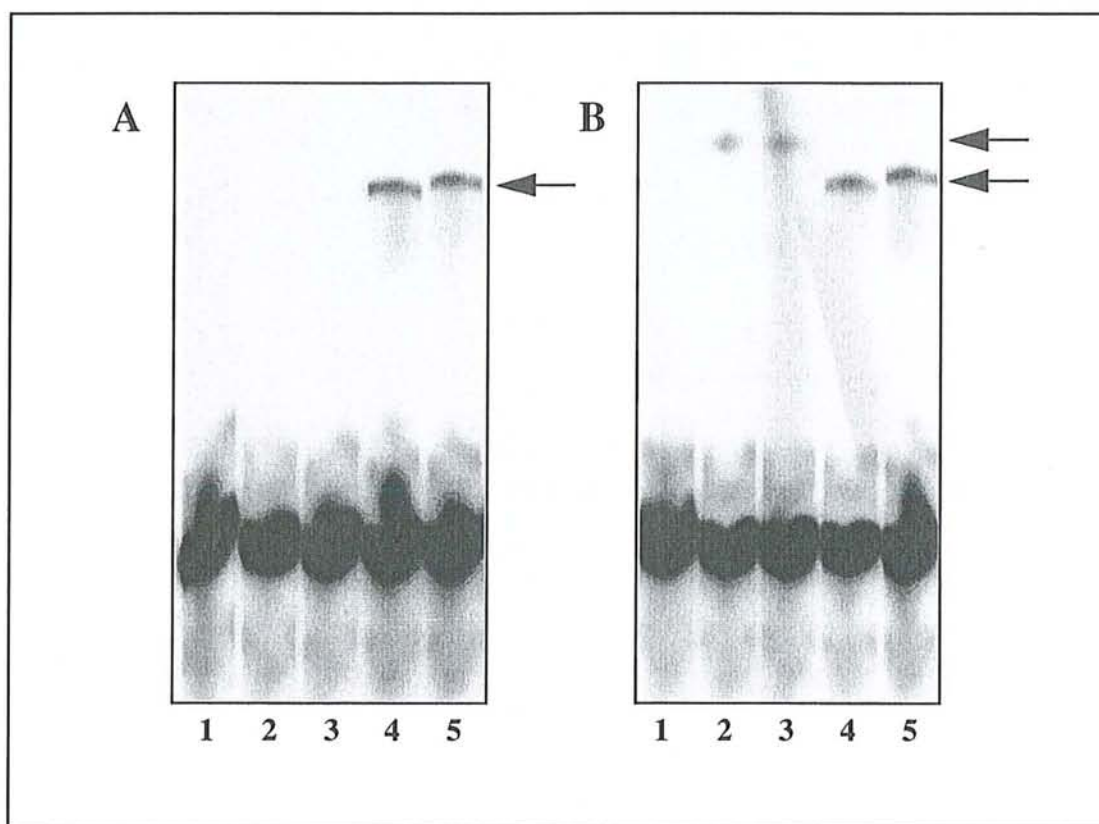


Figure 34. Glucuronoconjugaison de l'androstérone et de la 4MO par l'UGT2B7.

L'activité catalytique d'homogénats cellulaires (A, cellules V79 non transfectées et B, cellules V79-UGT2B7) est évaluée selon une méthode basée sur l'utilisation d'UDPGA radiomarké ($[^{14}\text{C}]$ UDPGA, 250000 dpm par essai, 0,025 mM d'UDPGA final) décrite au chapitre *Matériel et Méthodes*. Les glucuronides sont séparés par CCM. Les aglycones testés sont l'androstérone (lignes 2 et 3) et la 4MO (lignes 4 et 5). La ligne 1 est le contrôle sans aglycone.

Les flèches indiquent la position des glucuronides.

Tableau 10. Spécificité de substrat de l'UGT2B7 exprimée de manière stable dans les cellules V79.

Substrats	Activité Spécifique ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines)
<i>Kétoprofène</i>	13,1
<i>Androstérone</i>	12,5
<i>β-Estradiol</i>	8,5
<i>Epitestostérone</i>	32,7
<i>Acide hyodéoxycholique</i>	75,1

L'activité catalytique de fractions membranaires de cellules V79-UGT2B7 est évaluée par un essai basé sur la CCM couplée à la radiodétection, selon le principe décrit au chapitre *Matériel et Méthodes*, au moyen d'UDPGA radiomarké ($[^{14}\text{C}]$ UDPGA, 250000 dpm par essai, 0,025 mM d'UDPGA final). Les activités spécifiques sont exprimées en $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines et correspondent à la moyenne obtenue pour deux dosages enzymatiques indépendants.

avec un acide aminé histidine à cette position (UGT2B7H) (Jin *et al.*, 1993 ; Ritter *et al.*, 1990). Le polymorphisme de l'UGT2B7 ne semble pas impliqué dans une différence de spécificité de substrat très importante. Quelques différences seulement ont été observées. Ainsi, en accord avec nos résultats, l'équipe de Jin *et al.* (1993) a montré que l'UGT2B7Y a une activité catalytique envers le menthol et l'androstérone alors que l'équipe de Ritter *et al.* (1990) a démontré que la forme UGT2B7H est inactive envers ces mêmes substrats. Plus récemment, Patel *et al.* (1995) ont étudié l'énantiosélectivité de la glucuronoconjugaison du *RS*-oxazépam catalysée par des microsomes hépatiques humains. Ces auteurs ont observé que, dans 10% des préparations microsomales, les valeurs de K_m vis-à-vis du *S*-oxazépam sont significativement plus élevées alors que les valeurs de K_m envers le *R*-oxazépam restent inchangées. Les auteurs attribuent la variation du ratio glucuronide de *S*-oxazépam/glucuronide de *R*-oxazépam au polymorphisme porté par l'UGT2B7, sans qu'une étude directe sur les enzymes recombinantes ait été réalisée.

L'existence d'un polymorphisme des UGT est surtout attribuée à l'isoforme impliquée dans la conjugaison de la bilirubine (UGT1A1). La bilirubine est un métabolite toxique, issu du catabolisme des hémoprotéines, éliminée de l'organisme uniquement par glucuronoconjugaison. La bilirubine, qui possède deux fonctions carboxyles, est métabolisée sous forme de mono ou de diacylglucuronides. Deux maladies génétiques humaines relèvent d'une diminution ou d'une absence de glucuronoconjugaison de la bilirubine. Le syndrome de Gilbert affecte 2 à 5% de la population (Black & Billing, 1969). Il est caractérisé par une hyperbilirubinémie due à une déficience modérée de l'activité de glucuronoconjugaison et par une augmentation du taux de mono-acylglucuronide excrété dans la bile. La maladie de Crigler-Najjar est due à une diminution importante de la glucuronoconjugaison. C'est une maladie rare mais souvent fatale car elle provoque une hyperbilirubinémie élevée et prolongée. La capacité de transport de l'albumine plasmatique est alors saturée et la bilirubine libre s'accumule dans les lipides cellulaires, en particulier au niveau du système nerveux central, produisant des dommages neurologiques et pouvant conduire au décès des enfants atteints en l'absence de traitement par photothérapie ou transplantation hépatique en attendant la thérapie génique.

L'UGT2B7 est une isoforme humaine qui présente la particularité de conjuguer des composés aussi bien exogènes qu'endogènes possédant des structures chimiques très diverses (figure 36).

Parmi les xénobiotiques, un nombre important de médicaments à structure carboxylique, largement utilisés chez l'homme, sont substrats de l'UGT2B7. De nombreux AINS (kétoprofène, ibuprofène, naproxène, bénomaxaprofène, fénoprofène, diflunisal, indométhacine, acide tiaprofénique et zomépirac), mais également des agents hypolipémiants (acide clofibrique et dérivés) ou anticonvulsivants (acide valproïque) sont représentatifs de ces composés. L'acide salicylique n'est cependant pas conjugué par l'UGT2B7 (Jin *et al.*, 1993).

D'autres xénobiotiques, plus particulièrement des composés phénoliques (4MO, 1-naphtol, 4-nitrophénol, 4-hydroxybiphényle et 2-aminophénol) et hydroxylés (chloramphénicol, menthol, propranolol, oxazépam, témazépam) sont aussi métabolisés par l'UGT2B7, mais beaucoup plus faiblement que les acides carboxyliques (Jin *et al.*, 1993).

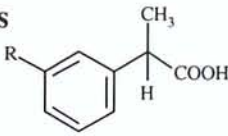
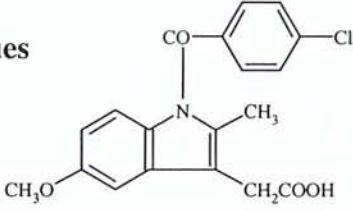
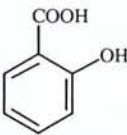
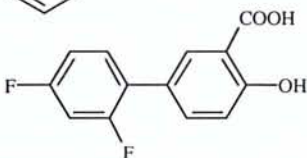
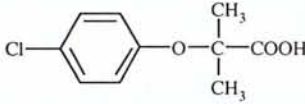
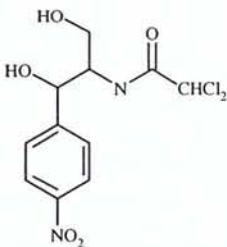
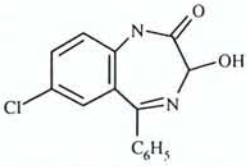
MÉDICAMENTS		UGT2B1 (rat)	UGT2B7 (homme)
AINS			
Acides propioniques <i>Profènes</i>		+++	++
Acides indolacétiques <i>Indométhacine</i>		-	+
Acides salicyliques <i>Acide salicylique</i>		+	-
<i>Diflunisal</i>		+	+
HYPOLIPEMIANTS			
<i>Acide clofibrique</i>		+	+
ANTICONVULSIVANTS			
<i>Acide valproïque</i>	$(\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH-COOH}$	+++	++
ANTIBIOTIQUES			
<i>Chloramphénicol</i>		++++	
ANXIOLYTIQUES			
<i>Oxazépam</i>		+	+

Figure 35. Comparaison de la spécificité de substrats des isoformes UGT2B1 (rat) et UGT2B7 (homme).

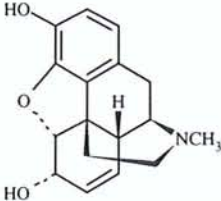
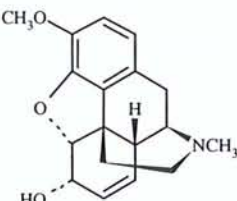
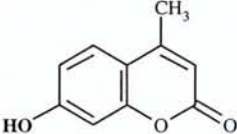
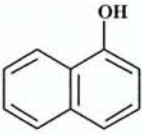
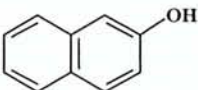
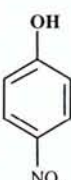
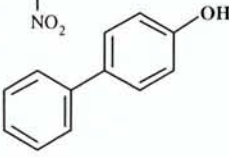
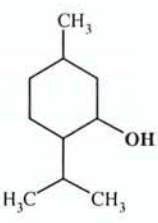
		UGT2B1 (rat)	UGT2B7 (homme)
MORPHINIQUES			
<i>Morphine</i>		+++++	++++
<i>Codéine</i>		-	+++
AUTRES XENOBIOTIQUES			
COMPOSES HYDROXYLES AROMATIQUES			
<i>4MO</i>		+++++	++
<i>1-Naphtol</i>		+	++
<i>2-Naphtol</i>		++++	
<i>4-Nitrophénol</i>			++
<i>4-Hydroxybiphényle</i>		+++++	+
COMPOSES HYDROXYLES ALIPHATIQUES			
<i>Menthol</i>			++

Figure 35. Comparaison de la spécificité de substrats des isoformes UGT2B1 (rat) et UGT2B7 (homme) (suite).

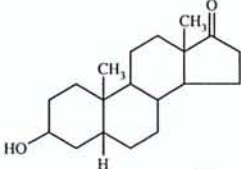
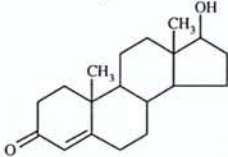
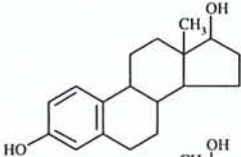
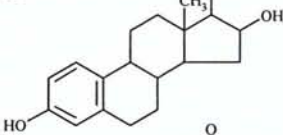
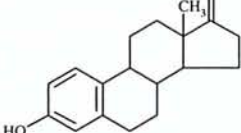
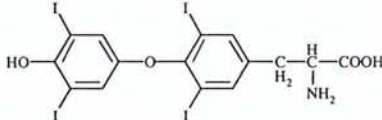
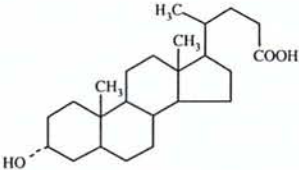
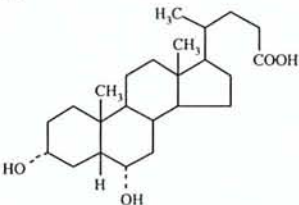
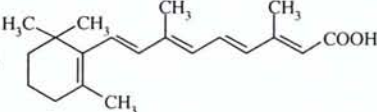
COMPOSES ENDOGENES		UGT2B1 (rat)	UGT2B7 (homme)
HORMONES STERODIENNES			
Androgènes			
<i>Androstérone</i>		-	++
<i>Testostérone</i>		+	
Oestrogènes			
<i>β-Estradiol</i>		-	
<i>Estriol</i>			+++
<i>Estrone</i>		-	
HORMONES THYROIDIENNES			
<i>L-Thyroxine</i>		+	
ACIDES BILIAIRES			
<i>Acide lithocholique</i>		++	
<i>Acide hyodéoxycholique</i>		-	++++
RETINOIDES			
<i>Acide rétinoïque tout-trans</i>		-	+++
ACIDES GRAS			
<i>Acide octanoïque</i>	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$	++++	
<i>Acide linoléïque</i>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$	+++	

Figure 35. Comparaison de la spécificité de substrats des isoformes UGT2B1 (rat) et UGT2B7 (homme) (suite).

En ce qui concerne les substrats endogènes, les hormones stéroïdiennes (estriol, 2-hydroxyestriol, 4-hydroxyestrone, androstérone) sont aussi substrats de l'UGT2B7. L'UGT2B7 semble être l'isoforme majeure impliquée dans la glucuronoconjugaison de l'androstérone. Cependant, elle n'intervient pas dans le métabolisme de la testostérone bien qu'elle catalyse la conjugaison de l'épitestostérone. L'activité catalytique de l'UGT2B7, évaluée dans les mêmes conditions expérimentales, est supérieure envers l'acide hyodéoxycholique que vis-à-vis des xénobiotiques. De plus, l'UGT2B7 semble métaboliser l'acide hyodéoxycholique avec un ordre de grandeur plus important que l'UGT2B4, qui est l'enzyme connue pour conjuguer préférentiellement ce substrat (Fournel-Gigleux *et al.*, 1989 ; Ritter *et al.*, 1992). L'acide hyodéoxycholique possède trois groupements susceptibles d'être glucuronoconjugés, deux hydroxyles en positions 3 α et 6 α et une fonction carboxyle terminale. Le 6 α -O-éther-glucuronide d'acide hyodéoxycholique est le principal métabolite chez l'homme. L'UGT2B4 a été identifiée comme l'isoforme humaine majoritairement responsable de sa biosynthèse (Pillot *et al.*, 1993). L'UGT2B7 est responsable de la formation d'un seul glucuronoconjugé de l'acide hyodéoxycholique. La fonction conjuguée de l'acide hyodéoxycholique par l'UGT2B7 n'a cependant pas été déterminée.

La diversité structurale des substrats conjugués par l'UGT2B7 semble indiquer une flexibilité du site catalytique particulièrement importante.

L'UGT2B7 est également impliquée dans la glucuronoconjugaison des opioïdes, plus particulièrement les dérivés morphiniques (morphine, codéine). La morphine porte deux fonctions hydroxyles en positions 3 et 6 (figure 14). Ces deux fonctions sont glucuronoconjugées chez l'homme alors que seule la fonction hydroxyle en position 3 l'est chez le rat (Coughtrie *et al.*, 1989). De même, la codéine, qui porte une seule fonction hydroxyle en position 6 (figure 14), est métabolisée par glucuronoconjugaison chez l'homme mais ne l'est pas chez le rat. Les deux variants de l'UGT2B7 (homme) sont les seules isoformes identifiées à ce jour capables de catalyser la glucuronoconjugaison de la morphine sur les deux hydroxyles en positions 3 et 6. L'UGT2B1 (rat) est responsable du métabolisme de la morphine seulement sur l'hydroxyle en position 3 (King *et al.*, 1997). Ainsi, l'UGT2B7 chez l'homme et l'UGT2B1 chez le rat, semblent être respectivement les isoformes d'UGT impliquées majoritairement dans la glucuronoconjugaison de la morphine et de la codéine. La glucuronoconjugaison de la morphine et de la codéine en position 6 par l'UGT2B7 présente un intérêt pharmacologique important. En effet, contrairement au 3-O-glucuronide de morphine inactif, le 6-O-glucuronide de morphine possède un pouvoir analgésique beaucoup plus important que la morphine elle-même (Frances *et al.*, 1990 ; Christrup, 1997). De même, le 6-O-glucuronide de codéine est un métabolite actif avec un fort pouvoir analgésique (Srinivasan *et al.*, 1996).

D'autres différences existent entre la spécificité de substrats de l'UGT2B7 et de l'UGT2B1.

L'UGT2B1 est également l'isoforme principalement impliquée dans le métabolisme des acides carboxyliques chez le rat, mais certains AINS comme le diflunisal ne sont pas pris en charge par cette enzyme alors qu'ils sont conjugués par l'UGT2B7 (Pritchard *et al.*, 1994 ; Jin *et al.*, 1993). En effet, l'UGT2B1 conjugue moins efficacement les composés possédant la fonction carboxylique adjacente à

un carbone aromatique, comme c'est le cas pour le diflunisal. L'UGT2B1 est faiblement active envers les xénobiotiques phénoliques (4MO, 1- et 2-naphtol, 4-hydroxybiphényl). En ce qui concerne les substrats endogènes, l'UGT2B1 prend en charge certaines hormones stéroïdiennes (testostérone) et thyroïdiennes (L-thyroxine) mais contrairement à l'UGT2B7, elle ne conjugue pas l'androstérone et l'estrone. Aussi, elle n'est pas responsable de la conjugaison de l'acide hyodéoxycholique mais métabolise l'acide lithocholique, qui ne diffère de l'acide hyodéoxycholique que par l'absence du groupement hydroxyle en position 6 α . Les acides gras sont principalement métabolisés par β oxydation. Cependant, les acides gras saturés à courte chaîne (acide octanoïque) et les acides gras insaturés (acide linoléique) peuvent être glucuronoconjugués par l'UGT2B1 lorsque les voies classiques de leur métabolisme sont défaillantes. Ni l'UGT2B7, ni l'UGT2B1 ne conjugue la bilirubine qui possède cependant deux fonctions acide carboxylique. Ce composé est effectivement métabolisé par une autre isoforme, l'UGT1A1.

En ce qui concerne la glucuronoconjugaison des AINS proféniques, les activités spécifiques observées pour l'UGT2B1 sont beaucoup plus importantes que pour l'UGT2B7. Nos résultats ont montré que les valeurs d'activité spécifique de l'UGT2B7 vis-à-vis du kétoprofène sont relativement faibles (environ 10 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines). Dans la littérature, des études d'énantiosélectivité, réalisées avec l'UGT2B1 et l'UGT2B7, donnent les mêmes résultats dans les deux cas. Les deux isoformes conjuguent le kétoprofène et le naproxène avec un ratio *R/S* proche de 1 alors que la forme *S* de l'ibuprofène est préférentiellement conjugquée à la forme *R*. Ces résultats sont concordants avec ceux de la glucuronoconjugaison de ces composés par des microsomes hépatiques humains et de rat. L'énantiosélectivité de la réaction est la même pour les deux espèces. Cependant, les activités spécifiques mesurées pour l'UGT2B7 sont relativement faibles comparées à l'UGT2B1. La question de l'existence d'une autre isoforme humaine impliquée plus spécifiquement dans le métabolisme des acides carboxyliques, notamment des AINS, reste posée, connaissant de plus la diversité des substrats catalysés par cette isoforme. Pour déterminer la contribution de l'UGT2B7 dans le métabolisme des AINS dans les microsomes hépatiques humains, il serait intéressant d'utiliser une stratégie basée sur le développement d'anticorps monospécifiques dirigés contre la partie *N*-terminale de l'UGT2B7. L'évaluation de la glucuronoconjugaison d'AINS catalysée par des microsomes hépatiques humains, partiellement inhibée par la présence des anticorps dans le site de fixation de l'aglycone sur l'UGT2B7, devrait permettre de déterminer un pourcentage de participation de cette enzyme au métabolisme des AINS. Cette stratégie d'étude a déjà permis au laboratoire de montrer que l'UGT2B4 humaine participe à 90% au métabolisme de l'acide hyodéoxycholique dans les microsomes hépatiques humains (Pillot *et al.*, 1993) et que l'UGT1A6 participe à 50% à la conjugaison des phénols plans dans les microsomes hépatiques humains (Ouzzine *et al.*, 1994).

D'autres isoformes sont cependant également impliquées dans le métabolisme des AINS. L'UGT1A3 est une isoforme capable de conjuguer des amines primaires, secondaires et tertiaires, mais aussi des composés hydroxylés et des acides carboxyliques, dont les AINS (Mojarrabi *et al.*, 1996 ; Green *et al.*, 1998). L'UGT1A9, par ailleurs impliquée dans le métabolisme des phénols encombrés est également capable de conjuguer les AINS (Ebner & Burchell, 1993).

Des analogies de séquences en acides aminés ont montré que l'UGT2B7 présente 82 % d'homologie de séquence avec l'UGT2B4 qui conjugue préférentiellement l'acide hyodéoxycholique, et 75,6 % d'homologie avec l'UGT2B8 qui est principalement impliquée dans le métabolisme de l'estriol. Ces enzymes présentent effectivement des spécificités de substrats qui se recoupent (conjugaison des stéroïdes). En revanche, l'UGT2B7, qui conjugue faiblement les phénols, partage moins de 50 % d'homologie avec les isoformes de la famille 1 (UGT1A6, UGT1A1,...), qui sont elles responsables de la glucuronoconjugaison des phénols et ne conjuguent pas les stéroïdes (Jin *et al.*, 1993).

11.2. Développement de stratégies d'étude de l'organisation du site actif des UGT : cas de l'UGT1A6 humaine

11.2.1. Développement et utilisation d'un marqueur d'affinité : l'*o*-UDPGA

Publication 3

Interaction of periodate-oxidized UDP-glucuronic acid with recombinant human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6

Eric Battaglia, Nadège Terrier, Magdalena Mizeracka, Claire Senay, Jacques Magdalou, Sylvie Fournel-Gigleux and Anna Radomska-Pandya

Drug Metabolism and Disposition **26**: 812-817 (1998)

Ce travail a pour but d'étudier les relations entre la structure et la fonction des UGT. Le marquage d'affinité est à ce sujet un outil puissant pour caractériser les acides aminés essentiels du site actif des enzymes. Les marqueurs d'affinité sont des molécules possédant des groupements réactifs capables de former une liaison covalente avec des résidus d'acides aminés et montrent de plus une affinité pour le site de fixation du/des substrat/s de l'enzyme étudiée, ils sont généralement des inhibiteurs compétitifs. Les dérivés dialdéhydriques, générés par oxydation des ribonucléotides par le périodate de sodium ou l'acide périodique, sont capables de réagir notamment avec les groupements amino-terminaux des protéines et avec certains acides aminés comme les lysines par formation de bases de Schiff et de dérivés dihydroxymorphilino. Ils constituent donc un groupe de composés intéressant pour être utilisés comme marqueurs d'affinité. Le périodate de sodium réagit avec l'UDPGA pour générer un dérivé réactif, l'*o*-UDPGA. L'objectif de ce travail a donc consisté à évaluer le pouvoir inhibiteur de cet analogue de l'UDPGA sur la glucuronoconjugaison de l'UGT1A6 afin de l'utiliser comme marqueur d'affinité pour étudier la structure du site actif de cette enzyme.

Nous avons montré que pour une concentration en *o*-UDPGA de 20 mM, l'inhibition de l'activité enzymatique de l'UGT1A6 est totale après 30 minutes d'inactivation à pH 7,4. Cette inhibition est de type irréversible, dépendante du temps et de la concentration en inhibiteur, et suit une cinétique de pseudo-premier ordre ($k_{\text{inact}} = 4,0 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Un effet de protection biphasique par le cosubstrat de la réaction, l'UDPGA, a été mis en évidence contre l'inactivation par l'*o*-UDPGA. Aucune protection n'est observée pendant la première phase, en revanche, une protection presque totale est montrée pendant la deuxième phase, ce qui suggère qu'au moins 65% de l'*o*-UDPGA se lie de manière covalente au site de fixation de l'UDPGA. Une inactivation partielle par l'*o*-UDPGA mène à une augmentation du K_m apparent pour l'UDPGA et à une diminution de la V_{max} apparente. Cette modification des paramètres cinétiques indique que l'*o*-UDPGA pourrait agir comme un inhibiteur spécifique du site actif de l'enzyme. De plus, nous avons montré que l'oxydation *in situ* par le périodate de sodium du $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{UDPGA}$ sur des fractions membranaires de cellules V79 exprimant l'UGT1A6 ainsi que sur des microsomes hépatiques de rat a lieu également dans le site actif de l'UDPGA. Les résultats présents suggèrent que l'*o*-UDPGA inactive l'UGT1A6 en se liant de

manière covalente selon un mécanisme de base de Schiff à un résidu lysine du site de fixation du cosubstrat de la protéine dans l'entourage du noyau ribofuranose.

L'*o*-UDPGA devrait donc pouvoir être utilisé comme un nouveau marqueur d'affinité pour étudier le site de fixation de l'UDPGA des UGT et apporter des informations complémentaires à l'utilisation des sondes photo-activables. L'étape suivante dans l'étude du site actif de l'UGT1A6 est de synthétiser l'*o*-UDPGA radiomarké, d'étudier sa fixation sur l'UGT1A6, enfin de purifier les peptides radiomarkés du site actif de l'UGT1A6 dans le but de les identifier par séquençage peptidique.

INTERACTION OF PERIODATE-OXIDIZED UDP-GLUCURONIC ACID WITH RECOMBINANT HUMAN LIVER UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE 1A6

ERIC BATTAGLIA, NADEGE TERRIER,¹ MAGDALENA MIZERACKA, CLAIRE SENAY, JACQUES MAGDALOU, SYLVIE FOURNEL-GIGLEUX, AND ANNA RADOMINSKA-PANDYA

Department of Internal Medicine, University of Arkansas for Medical Sciences (E.B., M.M., A.R.-P.), and URA CNRS 1288, Faculté de Médecine (N.T., C.S., J.M., S.F.-G.)

(Received December 22, 1997; accepted April 17, 1998)

This paper is available online at <http://www.dmd.org>

ABSTRACT:

Sodium periodate reacts with UDP-glucuronic acid (UDP-GlcUA) to generate a reactive derivative [periodate-oxidized UDP-GlcUA (*o*-UDP-GlcUA)]. The ability of this analog of UDP-GlcUA to inactivate and label the human recombinant UDP-glucuronosyltransferase (UGT) UGT1A6 via the UDP-GlcUA binding site was investigated. At an *o*-UDP-GlcUA concentration of 20 mM, the enzymatic activity of UGT1A6 was totally inactivated after 30 min of incubation at pH 7.4. Inhibition was irreversible, time-dependent, and concentration-dependent and exhibited pseudo-first order kinetics ($k_{\text{inact}} = 4.0 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$). Cosubstrate protection with UDP-GlcUA was biphasic, with no protection in the first phase and almost total protection in the second phase, suggesting that at least 65% of the cross-

linking occurs at the cosubstrate binding site. Partial inactivation by *o*-UDP-GlcUA led to a decrease in V_{max} , suggesting that *o*-UDP-GlcUA can act as an active site-directed inhibitor. Furthermore, proteins, including the UGTs, from membrane fractions of a recombinant V79 cell line expressing the UGT1A6 enzyme and from rat liver microsomes were cross-linked by *in situ* periodate oxidation of [β -³²P]UDP-GlcUA. The present results suggest that periodate-oxidized UDP-GlcUA, which inactivates UGT1A6 by the possible formation of a Schiff base adduct with active site lysyl residues, can be used as a new affinity label for the UDP-GlcUA binding site.

Glucuronidation is a major biotransformation pathway for thousands of endogenous and xenobiotic compounds. This biotransformation is catalyzed by a family of enzymes, the UGTs,² which are anchored in the membrane of the ER. The proposed transmembrane topology of UGTs describes proteins oriented predominately in the lumen of the ER, with a single α -helical membrane-spanning segment at the carboxyl terminus and a short sequence (positively charged) projecting into the cytoplasm (Jansen *et al.*, 1992). It has been proposed that the UDP-GlcUA binding site is located in the conserved carboxyl-terminal region of UGTs, whereas the variable amino-terminal region directs aglycone specificity (Mackenzie, 1990) and dimerization (Meech and Mackenzie, 1997).

For structural investigations, experimental tools that can be used for rapid characterization of UGTs in cellular extracts and membrane preparations are indispensable. Photoaffinity labeling of UGTs with [β -³²P]5N₃-UDP-GlcUA has been developed for probing the UDP-

GlcUA binding site. We have investigated the UDP-GlcUA binding domain of human UGT2B4 by expression in *Escherichia coli* of two peptides (amino acids 14–150 and 299–446) (Pillot *et al.*, 1993), as *Staphylococcus aureus* protein A fusion proteins. Photoaffinity labeling experiments suggest that the uridine binding site of UDP-GlcUA is located between amino acids 299 and 446, whereas the glucuronic acid binding site is in the amino-terminal sequence of amino acids 14–150.

Periodate-oxidized nucleotides, such as oxidized ATP and others, have been used extensively to label the active sites of various proteins (Colman, 1983). These compounds are known to modify lysyl residues more specifically than do other residues, by forming Schiff bases or dihydroxymorpholino adducts (Lowe and Beechey, 1982), although the guanidino group of arginyl residues can also be cross-linked (Kanaani *et al.*, 1995). Periodate-oxidized nucleotides are effective affinity labels for nucleotide-binding proteins, for the following reasons: the synthesis is usually easily accomplished, the structural analogy with the nucleotide is most often close enough for specific binding to the nucleotide site of the protein, and, finally, lysyl (or arginyl) residues present in the nucleotide binding site allow covalent binding of the oxidized ribose moiety.

We report here the covalent modification of UGT1A6, in membrane fractions from a recombinant V79 cell line expressing human liver UGT1A6, by a periodate-oxidized derivative of UDP-GlcUA. Our data indicate that inactivation of the enzyme results from covalent binding of *o*-UDP-GlcUA to the protein and that this binding occurs, at least partially, at the UDP-GlcUA binding site of recombinant human UGT1A6. We also provide evidence that *o*-UDP-GlcUA serves as an affinity label for UGT1A6.

This work was supported in part by National Institutes of Health Grants DK45123 and DK49715 (to A.R.-P.).

¹ This work was completed while N.T. was a student at Laboratoire de Biochimie Métabolique et Cellulaire, UFR SciFA, Université de Metz (Metz, France).

² Abbreviations used are: UGT, UDP-glucuronosyltransferase; ER, endoplasmic reticulum; SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; UDP-GlcUA, UDP-glucuronic acid; *o*-UDP-GlcUA, periodate-oxidized UDP-glucuronic acid; 5N₃-UDP-GlcUA, 5-azido-UDP-glucuronic acid; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.

Send reprint requests to: Anna Radomska-Pandya, Division of Gastroenterology, University of Arkansas for Medical Sciences, 4301 W. Markham, Slot 567-1, Little Rock, AR 72205.

Materials and Methods

Materials. UDP-GlcUA (sodium salt), *n*-butyric acid (sodium salt), and 4-methylumbelliferone (free acid) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All other reagents were of the highest grade commercially available.

Cell Cultures and Membrane Fraction Preparation. The V79 recombinant cell line expressing the human liver UGT1A6 was cultured as described previously (Battaglia *et al.*, 1994). Membrane fractions of ER were obtained according to the protocol described by Battaglia *et al.* (1994) and were stored at -80°C in 5 mM HEPES, 0.25 M sucrose, 20 mM MgCl_2 , pH 7.4. No decrease in the enzymatic activity of the recombinant protein was observed for up to 6 months under these conditions.

***o*-UDP-GlcUA Synthesis.** *o*-UDP-GlcUA was synthesized as described by Prehm (1985), with minor modifications; 154 μmol of UDP-GlcUA (sodium salt; Sigma) was dissolved in 0.5 ml of 200 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8. Oxidation was initiated by the addition (dropwise) of a 1.2-fold molar excess of a solution of sodium periodate (Sigma) dissolved in 0.5 ml of 200 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 (concentration of sodium periodate, 80 mg/ml). The reaction was carried out on ice in the dark, with continuous stirring. Oxidation of UDP-GlcUA was complete in <5 min under these conditions (as verified by HPLC; see below). Glycerol (50 μl of a 50%, v/v, solution) was added to terminate the oxidation, and the mixture was maintained under the same conditions for an additional 30 min, to scavenge unreacted periodate.

o-UDP-GlcUA was purified by ion-exchange chromatography on DE52 resin (Whatman, Maidstone, England). A $2 \times 15\text{-cm}$ gel column was equilibrated using 10 bed-volumes of water. The purification was performed at 4°C , with protection from light. The oxidized derivative of UDP-GlcUA was eluted from the column with a 1-hr linear gradient of 0.5 M NaCl, at a flow rate of ~ 3 ml/min; 4-ml fractions were collected. Iodate and unreacted periodate in the fractions were detected as described by Hinrichs and Eyzaguirre (1982). The purity of *o*-UDP-GlcUA was checked by HPLC (Rainin Instruments, Woburn, MA) with a Lichrosphere 5 RP18e column (250×4.0 mm; Phenomenex, Torrance, CA). The mobile phase consisted of 50 mM ammonium phosphate/phosphoric acid, pH 3.0, with 2.5% (v/v) methanol, and the product was eluted at a flow rate of 0.3 ml/min. UV absorbance was monitored at 260 nm. In this system, which was also used to check completion of the oxidation reaction before purification on the DE52 column, UDP-GlcUA and *o*-UDP-GlcUA exhibited retention times of 9.1 and 6.8 min, respectively. Fractions eluted from the DE52 column (free of iodine and presenting one HPLC peak, with a retention time of 6.8 min) were pooled and concentrated to dryness under vacuum. The residue was extracted with methanol, the extract was dried, and the residue was resuspended in water and stored at -80°C . The concentration of *o*-UDP-GlcUA was determined using an extinction coefficient of $10,000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. The stability of the oxidized derivative after storage was monitored by HPLC as described above.

Inactivation of Recombinant Human Liver UGT1A6 by *o*-UDP-GlcUA.

Inactivation of UGT1A6 was performed at 20°C under reduced lighting and was initiated by mixing membrane fractions of the recombinant cell line (4.9 mg of protein/ml) with *o*-UDP-GlcUA (2–25 mM) in 50 mM HEPES, 0.25 M sucrose, 20 mM MgCl_2 , pH 7.4. After incubation for various times (2–30 min), the inactivation was stopped by the addition of a 100-fold volume excess of 100 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl_2 , pH 7.4, containing a 20-fold molar excess of sodium borohydride (over *o*-UDP-GlcUA). In preliminary experiments, NaBH_4 alone did not inhibit the glucuronidation activity of UGT1A6. Enzymatic glucuronidation activity (3 μg of protein) toward 4-methylumbelliferone was assayed as previously described (Battaglia *et al.*, 1994), using a Perkin-Elmer fluorometer (excitation/emission, 320/380 nm). A control experiment in which *o*-UDP-GlcUA was omitted was performed simultaneously, to determine the fractional activity for a given time of inactivation. The inactivation kinetics were expressed as

$$\log A/A_0 = -k_{\text{obs}} \cdot t \quad (1)$$

where A/A_0 is the fractional activity after t min of inactivation and k_{obs} is the pseudo-first order inactivation constant for a given concentration of inactivator. For an inactivation process with an affinity label, k_{obs} is expressed according to

$$k_{\text{obs}} = -k_{\text{inact}}/(1 + K_i/[I]) \quad (2)$$

where k_{inact} is the inactivation rate constant, K_i the dissociation constant of the enzyme-affinity label complex (reversible step before inactivation), and $[I]$ the concentration of the inactivator (Kitz and Wilson, 1962).

The apparent K_M for UDP-GlcUA was determined for native and partially *o*-UDP-GlcUA-inactivated UGT1A6 with a constant saturating concentration of 4-methylumbelliferone (1 mM), over a UDP-GlcUA concentration range of 0.05–5.0 mM. Data fitting Michaelis-Menten kinetics were analyzed using EnzymeKinetics software (Trinity Software, Campton, NH).

Labeling with *In Situ* Periodate-Oxidized $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{UDP-GlcUA}$. $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{UDP-GlcUA}$ was synthesized as previously described (Battaglia *et al.*, 1996), resulting in a radiolabeled cosubstrate with a specific activity of approximately 2.5 $\text{mCi}/\mu\text{mol}$. Membrane fractions (50 μg of protein) from nontransfected V79 cells, recombinant UGT1A6, or rat (Sprague-Dawley) liver microsomes were incubated with 5 μM $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{UDP-GlcUA}$ in 100 mM HEPES, 15 mM MgCl_2 , pH 7.4, for 1 min at room temperature. *In situ* oxidation was initiated with 40 mM sodium periodate. After 1 min, NaBH_4 (final concentration, 200 mM) was added and the tubes were kept on ice for 1 hr; NaBH_4 was added again and incubation on ice was continued for an additional 1 hr. Proteins were separated by 10% SDS-PAGE, and rat liver UGTs were identified by Western blotting with a rat anti-*p*-nitrophenol-UGT antibody, a generous gift from M. Green and Dr. T. Tephly (University of Iowa, Iowa City, IA). UGT1A6 was identified by Western blotting, as previously described (Ouzzine *et al.*, 1994).

Preparative Gel Electrophoresis. The Bio-Rad Prep Cell model 491 was used essentially as described previously (Battaglia *et al.*, 1997); briefly, a 12% SDS-polyacrylamide running gel (pH 8.8, approximately 6×3 cm) was polymerized overnight. The stacking gel (pH 6.8, approximately 2×3 cm) was polymerized just before loading of the samples. Membrane fractions (5 mg of protein) from the recombinant cell line expressing the UGT1A6 enzyme were incubated with $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{UDP-GlcUA}$ (5 μM), oxidized with sodium periodate, and then reduced with NaBH_4 , as described above. Proteins were diluted 40-fold in water, concentrated by ultrafiltration through Centricon-30 membranes (Amicon, Beverly, MA), precipitated by addition of a 5-fold excess volume of 10% trichloroacetic acid, and mixed with prestained molecular mass markers (Sigma) [triose phosphate isomerase from rabbit muscle (35.2 kDa) and pyruvate kinase from chicken muscle (75.2 kDa)] in a denaturing buffer (3.6 M urea, 20 mM Tris, 0.14 M dithiothreitol, 5%, w/v, SDS, bromophenol blue, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed as previously described (Radomska and Drake, 1994). Selected fractions containing radiolabeled protein were subjected to analytical electrophoresis followed by Western blotting, as previously described (Ouzzine *et al.*, 1994).

Results

Preparation and Purification of *o*-UDP-GlcUA. *o*-UDP-GlcUA was prepared according to a published procedure (Prehm, 1985). It is known that *cis*-glycols are oxidized more quickly than are *trans*-glycols (Glick, 1969); therefore, this procedure cleaves and oxidizes the ribose ring of UDP-GlcUA between the 2'- and 3'-carbon atoms and leaves the glucuronic acid moiety intact (Prehm, 1985). After 5 min of periodate oxidation, UDP-GlcUA could not be detected by HPLC. The reaction was then quenched with an excess of glycerol. An improved purification procedure was developed using anion-exchange chromatography on a DE52 column and elution with a gradient of sodium chloride. The previously published method (size-exclusion chromatography) failed to separate iodate and unreacted periodate from *o*-UDP-GlcUA, which is critical because of the possible inhibitory effect of periodate on UGT activities. The postulated reaction mechanism of *o*-UDP-GlcUA binding is presented in fig. 1. Periodate-oxidized nucleotides react with amino groups of proteins, resulting in the formation of Schiff bases, which can be further stabilized by reduction with sodium borohydride (Löw *et al.*, 1992).

Time and Concentration Dependence of the Inactivation of UGT1A6 by *o*-UDP-GlcUA. Inactivation was performed at pH 7.4, to prevent β -elimination from periodate-oxidized nucleotides (Löw *et al.*, 1992). Preliminary experiments using a concentration range of

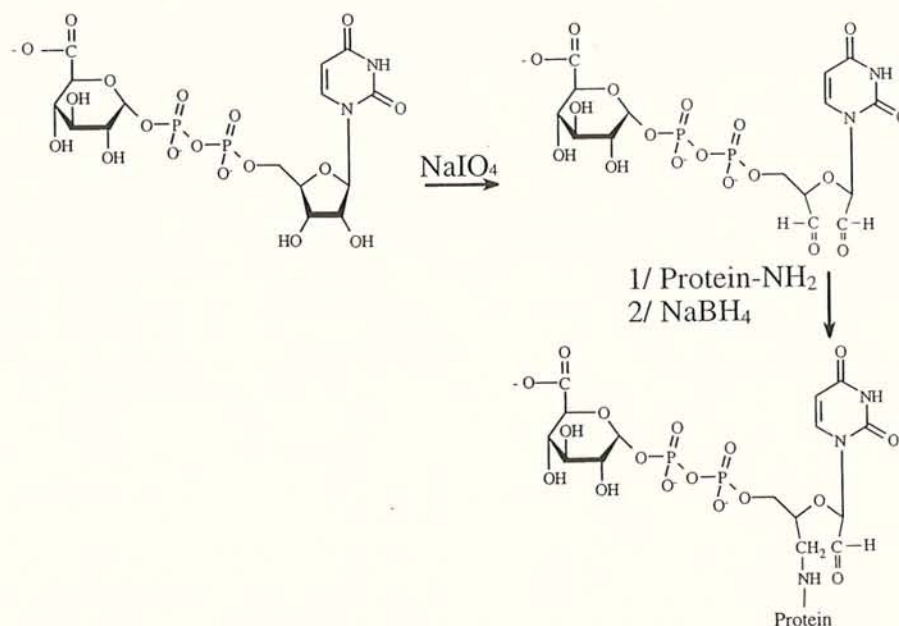


FIG. 1. Structure of *o*-UDP-GlcUA and postulated reaction mechanism of *o*-UDP-GlcUA binding.

5–20 mM *o*-UDP-GlcUA and 30-min inactivation demonstrated concentration-dependent inhibition of UGT1A6 activity (data not shown). Total inactivation was observed at a concentration of 20 mM *o*-UDP-GlcUA. Binding of the UDP-GlcUA analog to the UGT1A6 enzyme was irreversible, because extensive dilution of the *o*-UDP-GlcUA-treated membrane fractions did not suppress inhibition. To further characterize the effect of this UDP-GlcUA analog on enzyme activity, the time and concentration dependence of inactivation was studied (fig. 2). The linearity of the curves presented on a semilogarithmic scale is an indication of pseudo-first order inactivation (eq. 1). We also observed that the inactivation rate was enhanced in the presence of NaBH_4 . Therefore, it appears that at least a fraction of the adduct exists as a Schiff base, which can be reduced to a stable secondary amine by incubation with NaBH_4 . Inactivation also occurred without NaBH_4 but was less effective (approximately two thirds of the inactivation rate; data not shown), possibly because of the slow reversibility of the enzyme-inhibitor complex in the absence of a reducing agent under the experimental conditions used for enzymatic assays. The slopes of the curves represent the pseudo-first order inactivation constants for given concentrations of inactivator, and a replot of k_{obs} as a function of the concentration of *o*-UDP-GlcUA yielded a value of $4.0 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ for the second order inactivation rate constant. The k_{obs} values were proportional to *o*-UDP-GlcUA concentrations (2–25 mM) (fig. 2, inset), and higher concentrations of inhibitor could not be used because of limited solubility.

Partial UDP-GlcUA Protection of UGT1A6 from Inactivation by *o*-UDP-GlcUA. The influence of preincubation of the UGT1A6 enzyme with UDP-GlcUA on the inactivation by *o*-UDP-GlcUA was studied. Fig. 3A shows a biphasic effect of preincubation with the cosubstrate on the rate of inactivation by *o*-UDP-GlcUA. The first inactivation phase (phase I, ~0–10 min with 5 mM *o*-UDP-GlcUA), which accounts for approximately 35% of the inhibition, was not affected by UDP-GlcUA, whereas in the second phase (phase II, >10 min) UDP-GlcUA provided almost total protection from inactivation. This protective effect was further analyzed by evaluating the influence of increasing UDP-GlcUA concentrations on the residual activity observed after 5 min (phase I) and 30 min (phase II) of inactivation

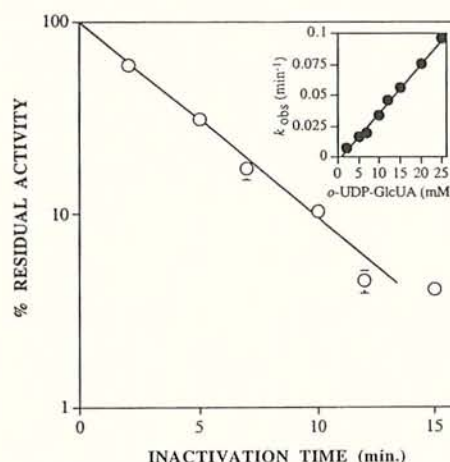
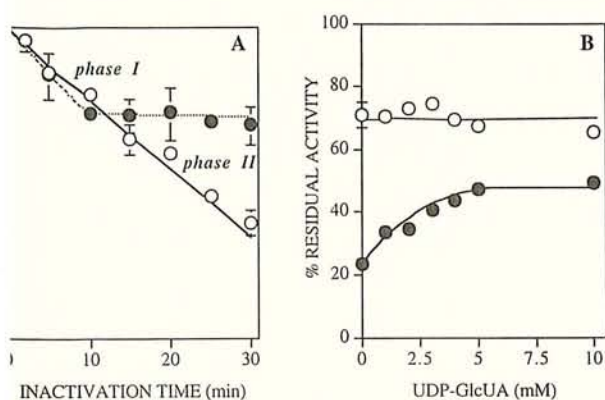


FIG. 2. Time-dependent inactivation of UGT1A6 by *o*-UDP-GlcUA.

Membrane fractions of UGT1A6 (4.9 mg of protein/ml) were incubated with 20 mM *o*-UDP-GlcUA for 2–15 min. Inactivation was determined as a function of time after 100-fold dilution, as described in *Materials and Methods*. The fractional activity was calculated after adjustment for the control assay, which did not contain *o*-UDP-GlcUA. Inset, plot of the inactivation constant (k_{obs}) as a function of the concentration of the inactivator (2–25 mM).

with 5 mM *o*-UDP-GlcUA (fig. 3B). Fig. 3B shows that UDP-GlcUA decreased the *o*-UDP-GlcUA inactivation of UGT1A6 in phase II (in a concentration-dependent and saturable manner), whereas identical UDP-GlcUA concentrations did not affect the inactivation in phase I. Therefore, after an initial nonspecific inactivation phase, almost total protection was observed with saturating concentrations of UDP-GlcUA.

Effects of Partial Inactivation with *o*-UDP-GlcUA on Some Kinetic Parameters of UGT1A6. Membrane fractions were inactivated with 15 mM *o*-UDP-GlcUA for 5 min, and the kinetic parameters for UDP-GlcUA were evaluated and compared with those of the native enzyme. Apparent K_M (UDP-GlcUA) and V_{max} values were $197 \pm 30 \mu\text{M}$ and $45 \pm 3 \text{ nmol/min/mg}$ (mean $\pm$ SD, $N = 3$) for the partially inactivated UGT1A6, compared with values of $133 \pm 58 \mu\text{M}$ and $107 \pm 10 \text{ nmol/min/mg}$ (mean $\pm$ SD, $N = 3$), respectively, for the



3. Effect of preincubation of UGT1A6 with UDP-GlcUA on inactivation kinetics.

Membrane fractions (4.9 mg of protein/ml) were treated with 5 mM *o*-UDP-GlcUA, with (●) or without (○) preincubation with 5 mM UDP-GlcUA. At the indicated, aliquots were obtained and diluted 100-fold (as described in *Materials and Methods*), and enzyme activity was measured. A control reaction with no UDP-GlcUA was carried out under the same conditions. B, Residual activity was measured after 5 min (○) or 30 min (●) of inactivation by 5 mM *o*-UDP-GlcUA, presence of increasing concentrations of UDP-GlcUA (1–10 mM).

enzyme. Therefore, partial inactivation of UGT1A6 by *o*-UDP-GlcUA appears to decrease the catalytic rate.

Labeling of UGTs with *In Situ* Periodate-Oxidized [β - 32 P]UDP-GlcUA

We previously synthesized [β - 32 P]UDP-GlcUA (Battaglia *et al.*, 1996). Here we have developed a new method for the affinity labeling of UGTs, by *in situ* periodate oxidation in the presence of this radiolabeled cosubstrate. The procedure for *in situ* labeling involved incubation of membrane fractions from recombinant V79 cells expressing human liver UGT1A6 or rat liver microsomes with [β - 32 P]UDP-GlcUA, oxidation with sodium periodate, and reduction of derivatized protein with an excess of NaBH₄. Substrate-protectant experiments (fig. 3) showed that some of the modified residues were not in the active site of the enzyme, raising the potential problem of nonspecific radiolabeling of proteins. *In situ* labeling of nucleotide-binding proteins has been shown to improve the binding specificity, compared with preoxidized nucleotides (Peter *et al.*, 1991). A low concentration of [β - 32 P]UDP-GlcUA (5 μ M) was also used to reduce nonspecific binding (Löw *et al.*, 1992). Covalent modification of the radiolabel into UGTs, as well as several other ER membrane proteins, was observed (fig. 4). Rat liver microsomal proteins, in the range (50–54 kDa) known to include the UGTs (Drake *et al.*, 1991), were labeled, as documented by autoradiography of gels of SDS-PAGE (fig. 4A). Detergent treatment is known to release enzyme activity latency in rat liver microsomes. Detergent treatment of the *in situ* labeling increased the overall background levels, producing a less clear pattern of radiolabeled proteins (data not shown). Furthermore, detergent treatment did not increase the labeling of UGTs, compared with intact microsomes, possibly because the *in situ* labeling method unsealed the vesicles or because of rapid transport of [β - 32 P]UDP-GlcUA into the lumen of the microsomes (Drake *et al.*, 1991). Fig. 4B shows the Coomassie staining (fig. 4B, lane 1), Western blot analysis (fig. 4B, lane 2), and corresponding autoradiographic analysis (fig. 4B, lane 3) of purified 32 P-labeled *o*-UDP-GlcUA-UGT1A6 complex obtained by preparative electrophoresis. From these results, *in situ* periodate oxidation of [β - 32 P]UDP-GlcUA appears to be an efficient method to radiolabel UGT1A6. The radiolabeling was not enhanced when gentler protein precipitation conditions (using organic solvents with no boiling and no acid or base) (Schell and Flugge, 1984) were used before electrophoresis. The stability of the cross-linked products (particularly under acidic con-

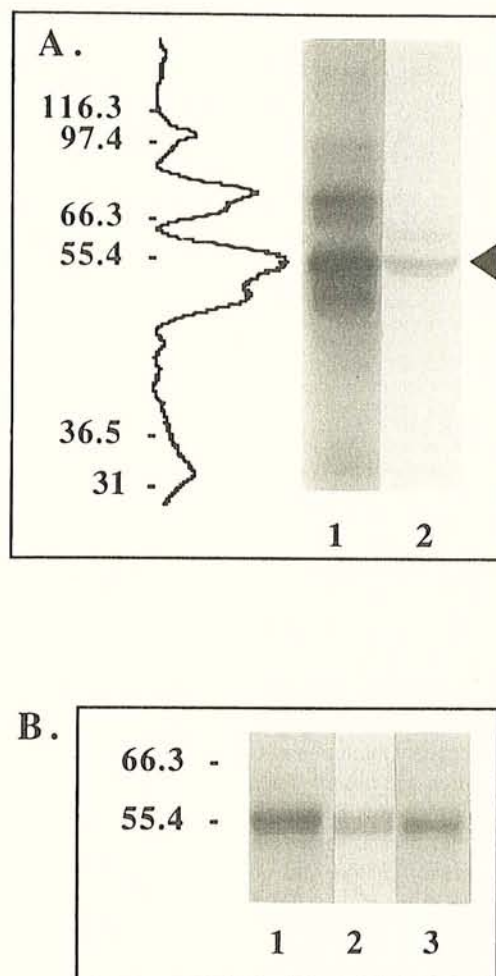


FIG. 4. Affinity labeling of rat liver microsomal proteins and recombinant human liver UGT1A6 with *in situ* periodate-oxidized [β - 32 P]UDP-GlcUA.

A, Rat liver microsomal proteins (50 μ g) were incubated with [β - 32 P]UDP-GlcUA (5 μ M) before *in situ* oxidation with sodium periodate, followed by reduction with NaBH₄ (as described in *Materials and Methods*). The radiolabeled proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography (lane 1). The radiolabeled UGTs identified by Western blotting with anti-*p*-nitrophenol-UGT antibody (lane 2) are indicated (arrowhead). The densitometric scan of the autoradiograph is shown on the left. B, Membrane fractions (5 mg of protein) of recombinant V79 cells expressing the UGT1A6 enzyme were incubated with [β - 32 P]UDP-GlcUA (5 μ M), oxidized, and then reduced as described for A. The radiolabeled UGT1A6 polypeptides were purified by preparative electrophoresis (as described in *Materials and Methods*). Fractions containing the UGT1A6 polypeptides were identified by Western blot analysis, concentrated by ultrafiltration, pooled, and analyzed on SDS-PAGE (lane 1, Coomassie staining), by Western blotting with a polyclonal, monospecific, anti-UGT1A6 antibody (lane 2), and by autoradiography (lane 3). The same amount of protein (10 μ g) was loaded in each lane.

ditions), combined with the enhanced inactivation by *o*-UDP-GlcUA in the presence of NaBH₄, suggested that the covalent binding was most likely achieved by means of a reduced Schiff base. Because we used [β - 32 P]UDP-GlcUA for *in situ* periodate oxidation and proteins were still labeled, it appears that the adduct does not undergo β -elimination (Lowe and Beechey, 1982). *o*-UDP-GlcUA is a homobifunctional cross-linking reagent, and this raised the possibility of inhibition by multiple intermolecular cross-links. The UGT1A6 enzyme was detected at its expected molecular mass by Western blotting after SDS-PAGE of membrane fractions treated with *o*-UDP-GlcUA under reducing conditions, excluding the possibility of multiple intermolecular cross-links (fig. 4B and results not shown).

Discussion

We have used UDP-GlcUA analogs (reversible inhibitors and photoaffinity probes) to characterize the cosubstrate binding site of UGTs (Drake *et al.*, 1992; Battaglia *et al.*, 1995). Although *o*-UDP-GlcUA has been used to label hyaluronate synthase (Prehm, 1985; Prehm and Mausolf, 1986), to the best of our knowledge this UDP-GlcUA analog has not been tested on UGTs. We demonstrated here that *o*-UDP-GlcUA cross-links with amino acid residues located in the UDP-GlcUA binding site.

The inactivation process obeyed pseudo-first order kinetics in the range of *o*-UDP-GlcUA concentrations used. However, no saturation kinetics could be observed under these conditions (fig. 2), suggesting that there was no reversible binding before inactivation. Therefore, no dissociable complexes between the UGT1A6 enzyme and the inactivator would be detectable. This was unexpected, considering the structural analogy of *o*-UDP-GlcUA with the enzyme cosubstrate (Prehm, 1985). Similar results have been recently observed with other compounds designed to be affinity labels (Nakamura *et al.*, 1995) or mechanism-based inhibitors (Braun *et al.*, 1995). In both cases, the most likely explanation for the observed nonsaturable inactivation was the relatively high K_i of the inhibitor. Therefore, considering eq. 2 described in *Materials and Methods*, for $K_i \gg [I]$, k_{obs} tends to $k_{inact} \cdot [I]/K_i$ and no saturation is apparent in the range of inactivator concentrations used, even in the presence of a dissociable intermediate complex. Higher concentrations of *o*-UDP-GlcUA could not be used because of limited solubility of the inactivator. However, partial inactivation of the enzyme affected V_{max} , suggesting that the binding of the probe impaired catalysis, as would be expected for a bulky ligand covalently bound within the UDP-GlcUA binding site.

Important evidence that *o*-UDP-GlcUA binds at the catalytic site can be obtained by cosubstrate-protection experiments. In the present studies, it was documented that the loss of glucuronidation activity produced by *o*-UDP-GlcUA could be prevented, in large part, by preincubation of the enzyme with unmodified UDP-GlcUA. Fig. 3 shows that the nonspecific binding (approximately 35%) of the inactivator was followed by specific binding of *o*-UDP-GlcUA within the active site. This dual effect of UDP-GlcUA on the inactivation of UGT1A6 by *o*-UDP-GlcUA suggests that the inhibitor modifies two classes of lysyl residues concomitant with the loss of activity. One class of reactive residues is not located within the UDP-GlcUA binding site, as evidenced by the lack of substrate protection depicted as phase I in fig. 3. The second class of residues reacts more slowly with the inactivator (phase II in fig. 3) and is protected against modification by UDP-GlcUA preincubation. This strongly suggests that this second class of modified residues is embedded in the active site of the enzyme. Substrate-protection experiments showed that the residues that are cross-linked most quickly are not protected by UDP-GlcUA. Because these residues are the first to react with the relatively hydrophilic inhibitor, they could be located on, or closer to, the protein surface, possibly in an area surrounding the active site. A similar observation has been made for the chemical modification by butanedione of arginyl residues of the UDP-GlcUA binding site of rat liver UGTs (Zakim *et al.*, 1983). This phenomenon has also been observed with periodate-oxidized nucleotides (Lowe and Beechey, 1982; Prehm, 1985; Rao *et al.*, 1991; Hilden *et al.*, 1995).

An additional application of the *in situ* oxidation of nucleotides involves their potential use as radiolabeled affinity probes to identify active site residues of the UGTs. Therefore, we studied the covalent incorporation of ^{32}P -labeled *o*-UDP-GlcUA into UGTs in rat liver microsomes and recombinant UGT1A6 in membrane fractions. The specificity of the labeling toward UDP-GlcUA-utilizing proteins was

evaluated by comparison of the affinity labeling using *o*-UDP-GlcUA with the photoaffinity labeling using $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDP-GlcUA}$. Photoaffinity labeling with $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDP-GlcUA}$ was used previously for the characterization of UDP-GlcUA-binding proteins (Drake *et al.*, 1991, 1992; Drake and Elbein, 1992; Radomska *et al.*, 1994). Comparison of the labeling of rat liver microsomes using $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDP-GlcUA}$ (Drake *et al.*, 1992) with the autoradiograph in fig. 4A shows that *in situ* periodate-oxidized $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{UDP-GlcUA}$ cross-linked the same proteins in rat liver microsomes as did the photoaffinity label; among these, the UGTs were predominant. The UGT1A6 enzyme in membranes from the recombinant cell line was also specifically labeled by *in situ* periodate-oxidized $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{UDP-GlcUA}$ (fig. 4B). In spite of the lower level of expression of the single UGT1A6 in this system (compared with total rat liver UGTs) and relatively high background labeling, significant radiolabeling of the recombinant enzyme was observed after purification by preparative electrophoresis (fig. 4B). *In situ* periodate oxidation of radiolabeled UDP-GlcUA avoids derivatization of the native sugar nucleotide to generate an affinity label, the extended side chain of which can sometimes preclude binding within the active site. Use of this ligand can be considered an alternative approach to the identification and characterization of UDP-GlcUA-utilizing proteins.

In the present study, we have shown that *o*-UDP-GlcUA, in addition to $5\text{N}_3\text{-UDP-GlcUA}$ (Drake *et al.*, 1992), is a useful affinity label for characterization of the active site of UGTs. Different amino acids within the active site can be identified with each of these active site-directed probes, based on their structural analogies with UDP-GlcUA and their reactivities toward amino acid residues of the active site. *o*-UDP-GlcUA probes an area of the active site surrounding the ribofuranose moiety of the cosubstrate, with high specificity for lysyl residues. $5\text{N}_3\text{-UDP-GlcUA}$, which carries the photoreactive azido group at the 5'-position of the uridine moiety of the cosubstrate, covalently reacts with amino acid residues of the active site surrounding the uracil base of UDP-GlcUA. Reliable data can be generated by probing the UDP-GlcUA binding site with both of these complementary, ^{32}P -labeled, affinity probes.

Our preliminary peptide-mapping studies of UGTs photolabeled with $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDP-GlcUA}$ support a site of cross-linking of the photoprobe with UGT1A6 between Val³⁵⁰ and Glu⁴⁰³. Alignment of this sequence with the amino acid sequences of known UDP-glycosyltransferases shows that this region is highly conserved (Hundt *et al.*, 1992). Several lysyl and arginyl residues are present in this region of UGT1A6. One of the residues, Lys³⁵¹, is especially interesting, because it is highly conserved in the UGTs. Strong conservation of Lys³⁵¹ among UDP-glycosyltransferases, in combination with our results indicating that this residue might be located in the active site, suggests that this residue might have an important function in the protein. Additional studies will be necessary to identify the amino acid(s) involved in the cross-linking in the active site of this enzyme.

Acknowledgments. We thank Prof. B. Burchell for providing the cDNA used to express UGT1A6 and J. Little for critically reviewing the manuscript.

References

- Battaglia E, Ellass A, Drake RR, Paul P, Treat S, Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Siest G, Vergoten G, Lester R and Radomska A (1995) Characterization of a new class of inhibitors of the recombinant human liver UDP-glucuronosyltransferase, UGT1*6. *Biochim Biophys Acta* 1243:9–14.
- Battaglia E, Nowell S, Drake RR, Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Senay C and Radomska A (1997) Photoaffinity labeling studies of the human recombinant UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 with 5-azido-UDP-glucuronic acid. *Drug Metab Dispos* 25:406–411.
- Battaglia E, Nowell S, Drake RR, Mizeracka M, Berg CL, Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Gollan JL, Lester R and Radomska A (1996) Two kinetically-distinct components of

- UDP-glucuronic acid transport in rat liver endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1283:223–231.
- Iattaglia E, Pritchard M, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Radomska A, Siest G and Magdalou J (1994) Chemical modification of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 by diethyl pyrocarbonate: possible involvement of a histidine residue in the catalytic process. *Arch Biochem Biophys* 309:266–272.
- Jbraun C, Brayer GD and Withers SG (1995) Mechanism-based inhibition of yeast alpha-glucosidase and human pancreatic alpha-amylase by a new class of inhibitors: 2-deoxy-2,2-difluoro-alpha-glycosides. *J Biol Chem* 270:26778–26781.
- Colman RF (1983) Affinity labeling of purine nucleotide sites in proteins. *Annu Rev Biochem* 52:67–91.
- Drake RR and Elbein AD (1992) Photoaffinity labeling of glycosyltransferases. *Glycobiology* 2:279–284.
- Drake RR, Igari I, Lester R, Elbein AD and Radomska A (1992) Application of 5-azido-UDP-glucose and 5-azido-UDP-glucuronic acid photoaffinity probes for the determination of the active site orientation of microsomal UDP-glucosyltransferases and UDP-glucuronosyltransferases. *J Biol Chem* 267:11360–11365.
- Drake RR, Zimniak P, Haley BE, Lester R, Elbein AD and Radomska A (1991) Synthesis and characterization of 5-azido-UDP-glucuronic acid: a new photoaffinity probe for UDP-glucuronic acid-utilizing proteins. *J Biol Chem* 266:23257–23260.
- Glick D (1969) *Methods of Biochemical Analysis*. Interscience Publishers, New York.
- Hilden I, Hove-Jensen B and Harlow KW (1995) Inactivation of *Escherichia coli* phosphoribosylpyrophosphate synthetase by the 2',3'-dialdehyde derivative of ATP. *J Biol Chem* 270:20730–20736.
- Hinrichs MV and Eyzaguirre J (1982) Affinity labeling of rabbit muscle pyruvate kinase with dialdehyde-ADP. *Biochim Biophys Acta* 704:177–185.
- Hundle BS, O'Brien DA, Alberti M, Beyer P and Hearst JE (1992) Functional expression of zeaxanthin glucosyltransferase from *Erwinia herbicola* and a proposed uridine diphosphate binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9321–9325.
- Jansen PLM, Mulder GJ and Burchell B (1992) New developments in glucuronidation research: report of a workshop on "Glucuronidation, Its Role in Health and Disease." *Hepatology* 15:532–544.
- Kanaani J, Maltby D, Focia P and Wang CC (1995) Identification of the active sites of human and schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases by GMP-2',3'-dialdehyde affinity labeling. *Biochemistry* 34:14987–14996.
- Kitz R and Wilson IB (1962) Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 237:3245–3249.
- Löw A, Faulhammer HG and Sprinzl M (1992) Affinity labeling of GTP-binding proteins in cellular extracts. *FEBS Lett* 303:64–68.
- Lowe PN and Beechey RB (1982) Interactions between the mitochondrial adenosinetriphosphatase and periodate-oxidized adenosine 5'-triphosphate, an affinity label for adenosine 5'-triphosphate binding sites. *Biochemistry* 21:4073–4082.
- Mackenzie PI (1990) Expression of chimeric cDNAs in cell culture defines a region of UDP-glucuronosyltransferase involved in substrate selection. *J Biol Chem* 265:3432–3435.
- Meech R and Mackenzie PI (1997) UDP-glucuronosyltransferase: the role of the amino terminus in dimerization. *J Biol Chem* 272:26913–26917.
- Nakamura J, Straub K, Wu J and Lou L (1995) The glutamine hydrolysis function of human GMP synthetase: identification of an essential active site cysteine. *J Biol Chem* 270:23450–23455.
- Ouzzine M, Pillot T, Fournel-Gigleux S, Burchell B, Siest G and Magdalou J (1994) Expression and role of the human liver UGT1*6 analyzed by specific antibodies raised against a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 310:196–204.
- Peter ME, She J, Huber LA and Terhorst C (1993) Labeling of adenine and guanine nucleotide-binding proteins in permeabilized cells with *in situ* periodate-oxidized nucleotides. *Anal Biochem* 210:77–85.
- Pillot T, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, LaFaurie C, Tebbi D, Treat S, Radomska A, Lester R, Siest G and Magdalou J (1993) Determination of the human liver UDP-glucuronosyltransferase 2B4 domains involved in the binding of UDP-glucuronic acid using photoaffinity labeling of fusion proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 197:785–791.
- Prehm P (1985) Inhibition of hyaluronate synthesis. *Biochem J* 225:699–705.
- Prehm P and Mausolf A (1986) Isolation of streptococcal hyaluronate synthase. *Biochem J* 235:887–889.
- Radomska A and Drake RR (1994) Synthesis and uses of azido-nucleoside diphosphate sugar photoaffinity analogs. *Methods Enzymol* 230:330–339.
- Radomska A, Paul P, Treat S, Towbin H, Pratt C, Little J, Magdalou J, Lester R and Drake RR (1994) Photoaffinity labeling for evaluation of uridyl analogs as specific inhibitors of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 1205:336–345.
- Rao GSJ, Cook PF and Harris BG (1991) Modification of the ATP inhibitory site of the *Ascaris suum* phosphofructokinase results in the stabilization of an inactive T state. *Biochemistry* 30:9998–10004.
- Wessell D and Flugge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138:141–143.
- Zakim D, Hochman Y and Kenney WC (1983) Evidence for an active site arginine in UDP-glucuronosyltransferase. *J Biol Chem* 258:6430–6434.

11.2.2. Utilisation de la modification chimique et de la mutagenèse dirigée

Publication 4**Role of the highly conserved cysteine 126 in the activity of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6**

Claire Senay, Gabrielle Jedlitschky, **Nadège Terrier**, Brian Burchell, Jacques Magdalou and Sylvie Fournel-Gigleux

Manuscrit soumis

L'UGT1A6 est une isoforme humaine largement impliquée dans le métabolisme des composés phénoliques et des substances toxiques chez l'homme. Dans un effort systématique de déterminer les acides aminés cruciaux pour la catalyse et la fixation des substrats, et après avoir mis en évidence l'existence de résidus arginine (Senay *et al.*, 1997), acides carboxyliques (Battaglia *et al.*, 1994b) et histidine (Battaglia *et al.*, 1994a ; Senay *et al.*, 1997) particulièrement importants, nous nous sommes intéressés aux cystéines. Ces acides aminés sont connus pour leur réactivité due à leur caractère électrophile et pour leur implication dans la formation de ponts disulfure. Deux cystéines sont très fortement conservées au sein des UGT. Il s'agit de la cystéine C277, localisée dans la partie C-terminale de la protéine, et de la cystéine C126, située du côté N-terminal.

Le choix de la mutation d'une cystéine s'est porté sur la cystéine 126. Nous avons montré que l'UGT1A6 est inhibée de manière irréversible par des réactifs sulfhydryl, plus particulièrement par des dérivés maléimides. La mutagenèse dirigée de l'acide aminé C126 en valine a mené à un mutant complètement inactif, tandis que le changement en sérine n'a pas complètement inhibé la glucuronoconjugaison de la 4MO catalysée par ce mutant. Les deux mutations n'affectent pas la stabilité de l'UGT1A6 et ne change pas la localisation subcellulaire de l'enzyme dans la membrane du RE. Les résultats indiquent que l'acide aminé C126, de part le caractère nucléophile de son atome de soufre, est important pour maintenir la structure active de la protéine mais n'est probablement pas impliqué dans la formation d'un pont disulfure au sein de la protéine.

Claire Senay ^a, Gabrielle Jedlitschky ^b, Nadège Terrier ^a, Brian Burchell ^b, Jacques Magdalou ^a and Sylvie Fournel-Gigleux ^a

^a UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré-Nancy 1, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy (France), and ^b Department of Molecular and Cellular Pathology and Medical School Ninewells Hospital, University of Dundee, Dundee DD1 9SY (UK).

Abstract

The UDP-glucuronosyltransferase 1A6 (UGT1A6) isoform is actively involved in the biotransformation of phenolic drugs and toxic substances in man. In an effort to gain insight on the amino acids that are important for the structure and function of this protein, we investigated the possible role of cysteinyl residues in this process. The enzyme was irreversibly inactivated by sulfhydryl reagents, especially *N*-phenylmaleimide. Site-directed mutagenesis of the conserved C126 into valine led to a fully inactive mutant, whereas replacement with serine did not completely abolish the activity, measured with 4-methylumbelliferone as a reference substrate. The two mutations did not impair the stability of UGT1A6 or change the subcellular localization in the endoplasmic reticulum. These results support the conclusion that C126 due to the nucleophilicity of the sulfur atom, is important for maintaining the active structure of the protein, and is likely not involved in a disulfide bond.

Key words

UDP-glucuronosyltransferase 1A6, crucial amino acid, cysteine, human liver.

Abbreviations

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; UGT, UDP-glucuronosyltransferase.

Correspondence to :

Dr. Sylvie Fournel-Gigleux

UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine

B.P. 184

54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex (France)

Tel. (33) 383 59 26 22

Fax (33) 383 59 26 21

e-mail sfg@facmed.u-nancy.fr

1. Introduction

UDP-glucuronosyltransferases constitute a multigenic family of enzymes actively involved in the biotransformation of drugs or endogenous compounds into hydrophilic glucuronides cleared in bile or urine (1). The human liver UGT1A6 isoform catalyzes the binding of glucuronic acid, from UDP-glucuronic acid, on phenolic and planar compounds, including drugs (acetaminophen, naftazone) (2, 3) and carcinogens (polycyclic aromatic hydrocarbons) (4). This isoform belongs to the UGT 1 subfamily and is highly expressed in different tissues, especially in the liver. By the nature of its substrates, this protein is believed to play a protective role against the intrusion of xenobiotics.

Our laboratory has been deeply involved in determining the peptide domains and amino acids of the UGT1A6 important for catalysis and substrate recognition. For this purpose, the cDNA encoding the protein has been stably expressed in V79 fibroblasts leading to the production of a highly active protein (5). Using amino-acid modifying reagents along with site directed mutagenesis, we recently demonstrated the crucial importance of Arg52 and His54 residues in an active protein conformation (6). On a similar way, carbodimide-inactivated UGT1A6 revealed the implication of an aspartyl or glutamyl residue in catalysis (7).

Cysteines, through their involvement in disulfide bonds constitute key amino acids that determine the tertiary structure of proteins and their biological function. The electrophilic sulfhydryl group can be actively engaged in interaction with other residues or participate to the catalytic mechanism. Conflicting results have been reported from experiments performed on rat or mouse liver microsomes with thiol reagents on the role of cysteine in the glucuronidation process. Storey (8) reported that the activity was very sensitive to *p*-chloromercuribenzoate or *N*-ethylmaleimide, leading to enzyme inactivation. By contrast, using similar compounds, Winsnes (9) found that enzyme catalysis was not dependent upon the presence of sulfhydryl groups. However, the enzyme activated by UDP-*N*-acetylglucosamine was very sensitive to these reagents. The heterogeneity of the microsomal fraction, differences in the incubation conditions in the presence of activating detergents or UDP-*N*-acetylglucosamine could account for such discrepancy.

Sequence alignment analysis of the UGT isoforms of subfamily 1 reveals the existence of two highly conserved cysteine residues (100 %, C126, C277). Particularly, C126 is located in the variable *N*-terminal region of UGT, which is believed to be implicated in the substrate specificity of these proteins by interacting with the aglycons (10). This strategical position makes C126 residue a potential candidate to play a key role in activity. On the other hand, C277 is located in the conserved *C*-terminal part of UGTs which contains the binding site of the common substrate, UDP-glucuronic acid.

In this work, the sensitivity of human liver recombinant UGT1A6 to various sulfhydryl reagents was investigated. The role of C126 of UGT1A6 was thereafter analyzed by site directed mutagenesis. The results indicate that this residue is important for enzyme activity and is probably not implicated in an internal disulfide bond.

2. Materials and methods

2.1. Inactivation of UGT1A6 by thiol directed reagents

Stable expression of wild-type UGT1A6 in V79 cells was performed as previously described (5). Recombinant V79 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-BRL) supplemented with 8% v/v NuSerum (Tebu), antibiotics and antimycotics. Cellular membranes containing the active enzyme were prepared by differential ultracentrifugations (11). The protein concentration was calculated according to the method of Bradford with serum albumin as standard (12). 4-Methylumbelliferone (Sigma) was used as reporter substrate to measure the glucuronidation activity of UGT1A6 and mutants. Formation of 4-methylumbelliferone glucuronide was followed by the fluorimetric method of Lilienblum et al. (13). The reaction was initiated by addition of 5 mM UDP-glucuronic acid (Boehringer Mannheim) to 20 μ g protein from membrane fractions, and incubated at 37°C for 20 min in 200 μ l of 180 mM Tris-HCl (pH 7.4), 30 mM MgCl₂, and 1 mM 4-methylumbelliferone. Fluorescence of 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide was determined at excitation and emission wavelengths of 320-380 nm, respectively (Hitachi F2000 spectrofluorimeter, Science Tech), and quantified with 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (Sigma) as authentic standard (0-10 nmol).

Modification of UGT1A6 by the sulfhydryl reacting agents, *N*-ethyl-, *N*-phenylmaleimide, iodoacetic acid (all from Aldrich), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) or methyl-methane thiosulfonate (Fluka) dissolved in dimethylsulfoxide at the concentrations ranging from 0 to 15 mM was performed at 25°C with membrane fraction (1.3 mg protein) in 50 mM sodium/potassium phosphate buffer (pH 7.0), 5 mM MgCl₂. A control experiment performed with the solvent alone was run simultaneously and corresponded to 100 percent of activity. The chemical modification was stopped at various periods of time by a 50-fold dilution in the phosphate buffer. 4-Methylumbelliferone activity was measured as described above. The pseudo-first-order rate constants of inactivation (k_i) and the second-order inactivation constant (k'_i) were calculated as previously indicated (6).

2.2. Site directed mutagenesis of C126

C126 of the recombinant human UGT1A6 was replaced by valine and serine, leading to the corresponding C126V and C126S mutants. Serine was chosen because it is structurally and functionally similar to cysteine, although the two residues possess significant differences in polarity. On the other hand, cysteine was changed into valine which presents a different nonpolar group. The plasmid pcDNA-UGT1A6 was previously constructed by cloning the UGT1A6 cDNA as a 2.0 Kb *HindIII*/*XbaI* fragment in pcDNA1.1 (Invitrogen) (14), under the control of the cytomegalovirus promoter. This plasmid served as a template for polymerase chain reactions with primers A (5'-CCCTAAACTAACCCTGC-3') and B (5'-CCTGCAGGAGGCTCTGGGAGTTG-3') for the C126S mutation, or primer A and C (5'-CCTGCAGGAGGCTCTGAACGTTG-3') for the C126V mutation. Primer A matches the proximal 5' untranslated region upstream the ATG start codon. Primers B and C matched with respectively the 5'-TCC-3' or 5'-GTT-3' triplet, instead of 5'-TGC-3', and the unique restriction

site *Sse8387I* (Amersham, Pharmacia Biotech). The reactions were carried out for 1 cycle, 3 min at 94°C; 15 cycles, 1 min at 94°C, 1 min at 52°C, 2 min at 72°C, and a final extension 5 min at 72°C. The PCR products were subcloned in the PCR2.1 vector following the instruction of the manufacturer (Amersham, Pharmacia Biotech). The *Bsu36I*/*Sse8387I* fragments (290 bp) were subcloned by replacing the corresponding fragments of the template DNA. The presence of the mutations and the absence of any desired mutation were confirmed by nucleotide sequence analysis.

2.3. Stable expression of mutant UGT1A6 cDNAs in V79 cells

V79 cells cultured in DMEM were co-transfected with each of the mutant UGT plasmids and SFVneo (5). One day after, the cultures were placed in a selection medium containing G-418 (1mg/ml). Up to thirty resistant colonies for each transfection were isolated, amplified and screened by immunofluorescence microscopy as described below.

2.4. Protein labeling in V79 cells

In vitro labeling of wild-type and UGT1A6 mutants was achieved with L-[³⁵S]-methionine (specific activity 1000 Ci/mmol, Amersham). Cells (60% confluency) were cultured for 2 hr in a methionine free RPMI medium (ICN) supplemented with 2 mM glutamine, 10% v/v NuSerum. Then, 2 ml of fresh medium containing 50 µCi of L-[³⁵S]-methionine were added. After 6 hr labeling, the cells were chased in a medium complemented with 0.5 mM cold L-methionine for 10hr. The cells were then washed with ice-cold phosphate buffered saline (Gibco), and immediately treated for immunoprecipitation.

Immunoprecipitation of the radiolabeled proteins was carried out as previously described (6), using antibodies raised against rat liver UGT (14). Briefly, the supernatant from cell lysis was incubated 1hr at 4°C with preimmune IgG and anti-UGT IgG in the second step in the immunoprecipitation buffer (0.5% w/v sodium cholate, 0.5% (v/v) Triton X-100, 150 mM KCl, 10 mM methionine, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5). Precipitation of the antigen-antibody complex was achieved by addition of Pansorbin cells (Calbiochem, Novabiochem). The immunoprecipitate was washed 3 times in a stringent solution containing 1 M KCl, and subjected to sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (10% w/v acrylamide). The radioactivity detection was enhanced by soaking the gel in 100 ml Enhance solution (NEN) for 60 min, before autoradiography.

For indirect immunofluorescence microscopy, monolayers of V79 cells were grown on glass coverlips to 70% confluency in DMEM, 8% v/v NuSerum. The cells were rinsed with phosphate buffered saline and fixed in 2% (w/v) paraformaldehyde for 20 min, followed by a 10-min incubation in 50 mM NH₄Cl/phosphate buffered saline, 20-min incubation in 0.2% (w/v) saponin/phosphate buffer saline, and 3 times 5-min incubation in 0.2 % (w/v) gelatin/phosphate buffered saline with 3 washes with phosphate buffered saline between each incubation.

Anti-UGT antibodies in 0.1% w/v saponin/phosphate, 1.5% bovine serum albumin/phosphate buffer saline were then incubated with cells for 1 hr. Cells were washed 3 times with 0.2 % (w/v)

gelatin/phosphate buffered saline, and then incubated for 30 min with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted 1:200 in 0.1% (w/v) saponin/phosphate, 1.5% (w/v) bovine serum albumin/phosphate buffered saline. The cells were then rinsed and mounted on glass coverlips. Immunofluorescence staining was observed using a Zeiss Axiophot microscope with a 100x objective. All fixation and antibodies incubations were performed at room temperature.

2.5. RNA expression analysis using RT-PCR

Total RNA from 5×10^6 V79 cells (nontransfected cells or cells expressing wild-type or mutant UGT1A6) was isolated using a RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's advice. The samples were DNase (Promega) treated for 20 min before reverse transcription of 1 μ g of RNA by M-MLV reverse transcriptase (Promega). After dilution up to 40 μ l, 2 ml of each sample was used for PCR with Taq DNA polymerase (Promega). The sense and antisense primers matched the 5' and 3' end of the coding region, respectively. The PCR was performed under conditions of 1 cycle, 3 min at 94°C, 30 cycles each at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final extension step at 72°C for 5 min. The samples (10 μ l) were analyzed by 1% (w/v) agarose gel electrophoresis in 0.09 M Tris - 0.09 M boric acid (pH 8.0), 2.0 mM EDTA.

3. Results

3.1. UGT1A6 is irreversibly inactivated by *N*-phenylmaleimide

Fig. 1 shows the relative sensitivity of 4-methylumbelliferone glucuronidation catalyzed by UGT1A6 to various thiol-directed reagents. A marked decrease was caused by *N*-phenylmaleimide. A concentration of 2.5 mM decreased up to 50% the activity. 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) was also inhibitory, but at higher concentrations. By contrast, the other cysteine modifying agents tested, *N*-ethylmaleimide, iodoacetic acid and methyl-methane thiosulfonate failed to affect the activity significantly, over the concentration range used (Fig. 1). Furthermore, the most effective inhibitor, *N*-phenylmaleimide could decrease the glucuronidation reaction as a function of time and concentration (Fig. 2A). The inactivation pattern was typical of an irreversible inhibition and indicated that the inactivation of the enzyme by *N*-phenylmaleimide followed a pseudo-first order kinetics. Plots of the logarithm of the apparent kinetic constants *versus* the logarithm of the concentration of *N*-phenylmaleimide (Fig. 2B) gave a straight line, allowing the determination of k'_i , $9,290 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and the reaction order (n), 0.36.

3.2. Expression and catalytic activity of C126S and C126V UGT1A6 mutants

Two UGT1A6 cDNAs bearing mutations of the highly conserved Cys126 (C126S, C126V) were constructed and stably expressed in V79 cells. The mRNA expression in the transfected V79 cells with wild-type and mutant UGT1A6 cDNAs was estimated by RT-PCR. In all samples investigated, amplicons of the expected size (1.6 kB) were obtained (Fig. 3), whereas none was

detected in nontransfected cells. However, V79 cells expressing wild-type UGT1A6 showed more transcripts (Fig. 3, lane 2) than those expressing each of the two mutants (Fig. 3, lanes 6 and 8). In terms of mRNA expression, C126S and C126V behaved similarly.

The ability of the two mutants to glucuronidate 4-methylumbelliferone was thereafter determined. The C126V mutant presented no detectable activity. By contrast, the C126S mutant could glucuronidate the drug (specific activity, $3.0 \pm 1.0 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$). The activity was 12 times lower than that of the wild type protein ($35.8 \pm 0.7 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$). The difference in the level of expression could, in part, account for such difference. This observation indicates that, serine, but not valine, could replace cysteine for catalysis to some extent. The results emphasized the role of the highly conserved C126 in an active conformation of UGT1A6.

3.3. Immunofluorescence microscopy

To examine whether the mutation affects the subcellular localization of the protein, immunocytochemistry was performed on V79 cells with an antibody raised against UGT (14). The cell expressing the wild-type UGT1A6 showed a staining that was typical of a endoplasmic reticulum localization, as represented in a recent study (15). By comparison with control untransfected cells which presented no marked staining, the cells expressing the two mutants showed a characteristic endoplasmic reticulum localization, which was similar to that of the wild-type UGT1A6 (results not shown).

3.4. The mutations did not impair the stability of the mutants

The stability of the mutants compared to that of the wild-type UGT1A6 protein was investigated by pulse-chase experiments (Fig. 4). Nontransfected and V79 transfected cells were labeled with L-[³⁵S]-methionine for 6hr and chased for 0 to 10hr. The proteins were immunoprecipitated with antibodies raised against UGT and analyzed by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. The autoradiograms (Fig. 4) show that at the beginning of the chase, the expression of the wild-type UGT1A6 was stronger than that of the two mutants. After a chase of 10hr, as expected, the radioactivity associated to the proteins has decreased, but at the same extent, thus indicating that the turnover of UGT1A6 and mutants was similar during this time period. The mutations of the C126 into valine or serine did not significantly affect the stability of the protein. This result further suggests that modification of structure possibly induced by the mutation did not accelerate protein degradation. The lower level of expression of the mutant was not related to a different turnover of the protein.

4. Discussion

In this study we intended to assess the role of cysteinyl residues of UGT1A6 by covalent modification with thiol-directed reagents and by site-directed mutagenesis. The sensitivity of the recombinant UGT1A6 stably expressed in V79 cells was evaluated toward several thiol reagents which differed by their reactivity group and lipophilicity. Only the more hydrophobic compound

of the series, *N*-phenylmaleimide, could irreversibly inactivate the glucuronidation reaction. UGT are membrane-bound enzymes. Hypothetical topology model of UGT based on hydropathy analysis and experimental evidence suggests that the main part of the enzyme is embedded within the phospholipid bilayer, with the active site oriented toward the lumen part of the endoplasmic reticulum (16). The absence of inhibition by hydrophilic thiol specific reagents that could not cross the membrane indicates that the modified crucial cysteine residue is in an hydrophobic environment. It is worth to note that, when carbodiimides were used to determine the possible involvement of carboxylic acid amino acids on the glucuronidation reaction catalyzed by UGT1A6, the most hydrophobic reagent, diclohexylcarbodiimide, could inactivate the enzyme, whereas, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide was less inhibitory (17).

N-ethylmaleimide failed to inactivate UGT1A6. Similar results have been reported by Winsnes, who showed that this reagent was ineffective in native as well as in Triton X-100 disrupted microsomes (9). However, addition of the physiological allosteric activator, UDP-*N*-acetylglucosamine, led to an enzyme sensitive to thiol reagents, probably by a conformational change that makes cysteinyl residues more accessible to the compound, or by modification of the UDP-glucuronic acid transport. In conclusion of this part, the use of the recombinant UGT1A6 stably expressed in V79 cells allowed us to demonstrate unambiguously that the protein is sensitive to thiol-directed reagents.

Two cysteine residues (C126 and C277) are highly conserved among the sequences of the UGT isoforms, thus emphasizing their potential critical role. In order to investigate this point, site-directed mutagenesis of C126 was undertaken. This residue was chosen because of its location in the *N*-terminal half domain of the UGT1A6, which is believed to interact with 4-methylumbelliferone and to be implicated in the substrate specificity of the enzyme (10). Substitution of C126 by valine completely abolished the activity. This result suggests that the hydrophobic part of the valine residue could not replace the hydrophilic thiol group for maintaining an active conformation. By contrast, changing C126 into a serine led to a mutant which was still active, although an important decrease in enzyme activity was observed. This very weak activity did not allow to perform kinetic studies. The lower nucleophilicity of the hydroxyl group of serine, by comparison with the thiol residue of cysteine, was likely to affect interactions with amino acid residues leading to a partially efficient protein. In both cases, substitution of cysteine by serine or valine did not change the turnover of the mutants, when compared to the wild-type protein, thus suggesting that the mutations did not induce a marked change in the tertiary structure of the protein. Immunocytochemistry experiment suggested that cysteine substitution did not affect membrane targeting of UGT1A6. From these results we believe that C126 is a crucial amino acid residue which takes part to the active structure of UGT1A6 by establishing important interaction through its nucleophilic thiol group with other amino acids. We can also anticipate from the activity of the C126S mutant that this cysteinyl residue is not involved in an internal disulfide bond.

Interestingly, using the chemical cross-linking reagent 1,6-bis(maleimido)-hexane, Ikushiro *et al* (18) reported the establishment of active homo/heterodimers of UGTs belonging to families I

and 2 within the membranes of rat liver. These protein-protein interactions could implicate critical cysteine residues from both monomers and lead to a functional complex sensitive to the stimulation by UDP-*N*-acetylglucosamine. Additionally, Meech and Mackenzie (19) reported that UGTs can interact through their amino acid terminal domains to form these catalytically active dimers. In these conditions, C126 could be a potential candidate for such interaction. More experiments are needed to ascertain this point.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Région Lorraine and by the Wellcome Trust.

References

- [1] Mackenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B., Bock, K.W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., RoyChowdhury, J., Ritter, J.K., Schachter, H., Tephly, T.R., Tipton, K.F., Tukey, R.H. and Nebert, W. (1997) *Pharmacogenetics* 7, 255-269.
- [2] Bock, K.W., Forster, A., Gschaidmeier, H., Brück, M., Münzel, P., Schareck, W., Fournel-Gigleux, S. and Burchell, B. (1993) *Biochem. Pharmacol.* 45, 1809-1814.
- [3] Herber, R., Hercelin, B., Van Cantfort, J., De Graeve, J., Fournel-Gigleux, S., Taguchi, T. and Magdalou, J. (1995) *Drug Metab. Dispos.* 23, 1305-1314.
- [4] Bock, K.W. (1991) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26, 129-150.
- [5] Fournel-Gigleux, S., Sutherland, L., Sabolovic, N., Burchell, B. and Siest, G. (1991) *Mol. Pharmacol.* 39, 177-183.
- [6] Senay, C., Ouzzine, M., Battaglia, E., Pless, D., Cano, V., Burchell, B., Radomska, A., Magdalou, J. and Fournel-Gigleux S. (1997) *Mol. Pharmacol.* 51, 406-413.
- [7] Battaglia, E., Senay, C., Fournel-Gigleux, S., Herber, R., Siest, G. and Magdalou, J. (1994) *FEBS Lett.* 309, 266-272.
- [8] Storey I.D.E. (1965) *Biochem. J.* 95, 201-208.
- [9] Winsnes, A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 242, 549-559.
- [10] Mackenzie, P.I. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 3432-3435.
- [11] Battaglia, E., Pritchard, M., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S., Siest, G., Radomska, A. and Magdalou, J. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* 309, 266-272.
- [12] Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [13] Lilienblum, W., Walli, A.K. and Bock, K.W. (1982) *Biochem. Pharmacol.* 31, 907-913.
- [14] Coughtrie, M.W.H., Burchell, B., Leakey J.E.A. and Hume, R. (1988) *Mol. Pharmacol.* 34, 729-735.
- [15] Ouzzine, M., Magdalou, M., Burchell B. and Fournel-Gigleux S. (1999) *FEBS Lett.*, 1999, 454, 187-191.
- [16] Jansen P.L.M., Mulder G.J., Burchell B. and Bock K.W. (1992) *Hepatology*, 15, 532-544.
- [17] Battaglia B., Senay C., Fournel-Gigleux S., Herber R., Siest G. and Magdalou J. (1994) *FEBS Lett.*, 346, 146-150.
- [18] Ikushiro S., Emi Y and Iyanagi T. (1997) *Biochemistry*, 36, 7154-7161
- [19] Meech, R., and Mackenzie, P. I. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 26913-26917.

Fig. 1. Effect of sulfhydryl reagents on the glucuronidation of 4-methylumbelliferone by UGT1A6.

Membranes of V79 cells expressing UGT1A6 were incubated with 0 to 15 mM *N*-ethylmaleimide (▲), *N*-phenylmaleimide (●), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (⊕), iodoacetic acid (■) and methyl- methane thiosulfonate (◆) dissolved in dimethylsulfoxide. The enzyme activity (mean ± SD, n = 3 experiments) was expressed as percentage of residual activity, with 100 % activity obtained without sulfhydryl reagents. The initial specific activity was 26.0 nmol/min.mg protein.

Fig. 2. Kinetics of inactivation of UGT1A6 by *N*-phenylmaleimide.

A, Inactivation by *N*-phenylmaleimide 1.0 mM (●), 3.0 mM (■), 7.0 mM (▲) and 10.0 mM (◆). A/A_0 corresponds to the ratio of the activity in the presence of inhibitor, at the time point considered vs the initial activity without inhibitor.

B, Plots of the pseudo-first order inactivation rate constants as a function of *N*-phenylmaleimide concentration.

Fig. 3. Analysis of the RT-PCR amplicons from UGT1A6 and cysteine mutants.

Lane 9, molecular weight standards; lane 8, positive control of the PCR using UGT1A6 cDNA as template; lane 7, RT-PCR from nontransfected V79 cells; lane 6, wild-type UGT1A6; lane 4, C126V mutant; lane 2, C126S mutant; lanes 5, 3, 1, PCR performed on the samples wild-type UGT1A6 and two mutants, before RT, respectively, as controls.

Fig. 4. [³⁵S]-Methionine labeling and immunoprecipitation of UGT1A6 and cysteine mutants expressed in V79 cells.

Nontransfected (NT), and V79 cells transfected with cDNAs encoding the wild-type (WT) and C126V and C126S mutants were labeled with L-[³⁵S]-methionine for 6hr and chased for 0 to 10hr with cold methionine. The proteins were immunoprecipitated with antibodies raised against UGT and analyzed by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis.

Figure 1

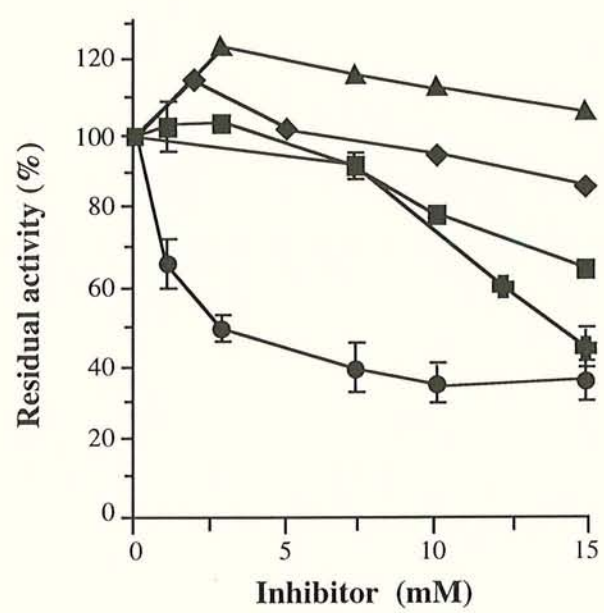


Figure 2

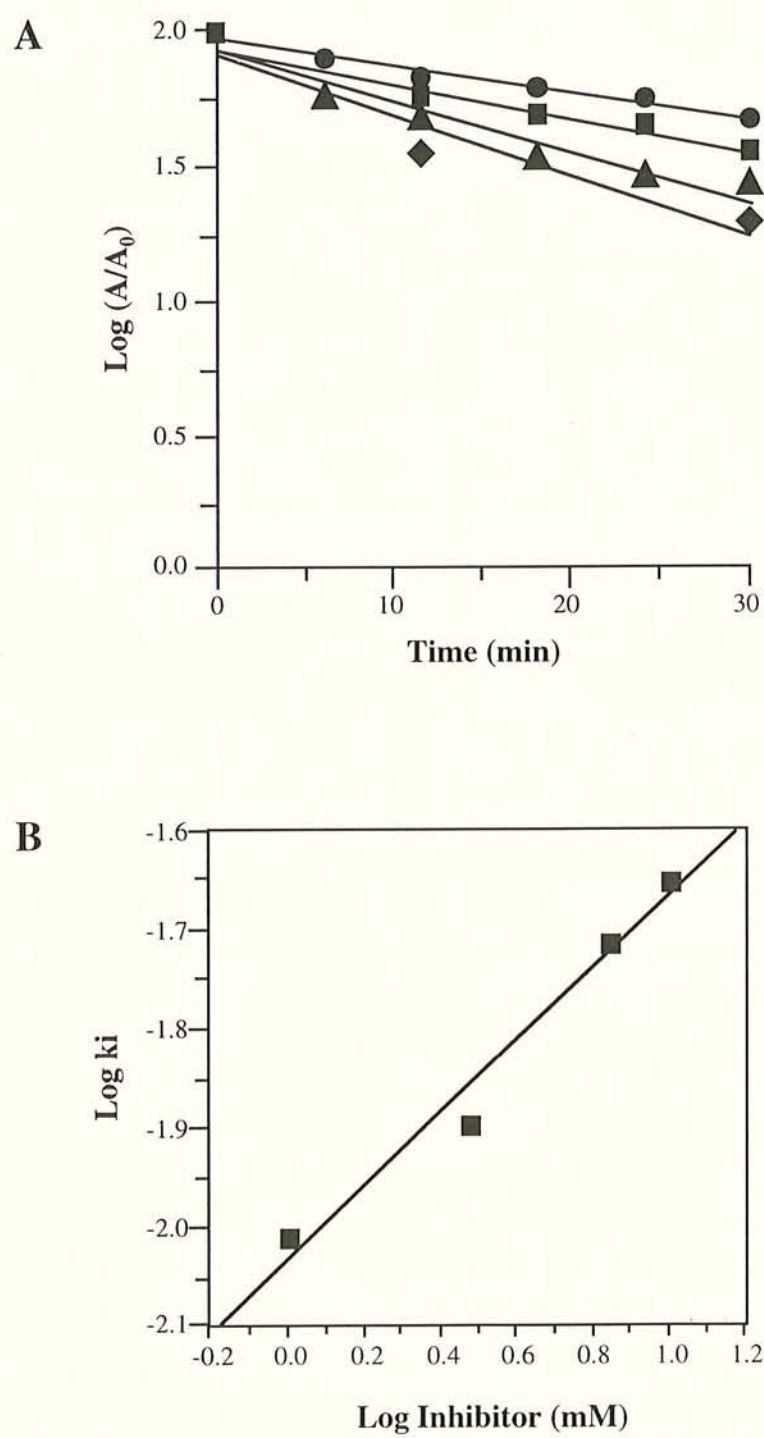


Figure 3

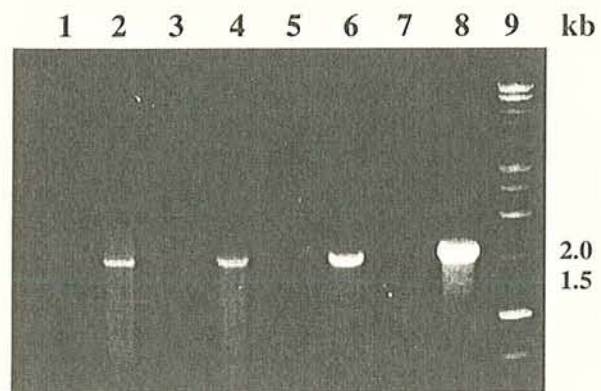
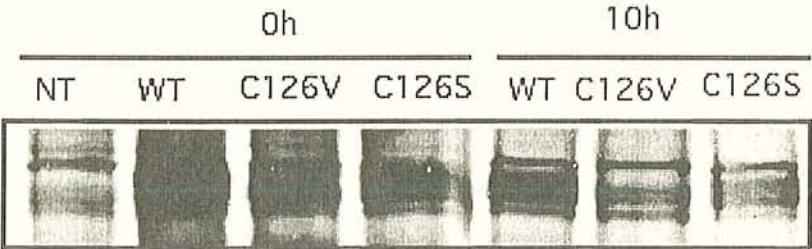


Figure 4



11.3. Application des stratégies développées à l'étude de l'organisation du site actif de l'UGT2B7 humaine

Publication 5

A functional role for acidic amino acids of the human liver recombinant UDP-glucuronosyltransferase 2B7 in catalysis

Nadège Terrier, Piotr Czernik, Guangping Chen, Sylvie Fournel-Gigleux, Jacques Magdalou and Anna Radomska-Pandya

Manuscrit en préparation

Ce travail propose d'explorer l'organisation du site actif de l'UGT2B7 recombinante exprimée de manière stable dans des cellules de mammifères. La stratégie développée fait appel à deux techniques utilisées précédemment pour étudier le site actif de l'UGT1A6. L'une est la modification chimique d'acides aminés par des agents spécifiques, et l'autre le marquage de photo-affinité par des sondes photo-activables, analogues du site actif de l'UDPGA ou de l'aglycone. Le choix des acides aminés à modifier a été réalisé d'après l'alignement des séquences peptidiques de protéines impliquées dans le métabolisme de l'acide rétinoïque (notamment l'UGT2B7), et de protéines interagissant avec l'acide rétinoïque (CRABP, récepteurs nucléaires RAR). L'alignement de ces séquences a conduit à l'identification d'une séquence consensus entre l'UGT2B7, les CRABP et les RAR (TKTELEN). Cette séquence présente notamment deux acides aspartiques situés dans la partie *N*-terminale de l'UGT2B7. Notre hypothèse est que ces deux acides aspartiques pourraient être localisés dans le site actif de l'acide rétinoïque. L'importance de résidus aminés acides carboxyliques dans la catalyse de l'UGT1A6 avait déjà été décrite dans notre équipe (Battaglia *et al.*, 1994b).

Les conséquences de la modification chimique des acides carboxyliques par des carbodiimides (DCCI, EDC, WK) sur la glucuronoconjugaison catalysée par l'UGT2B7 ainsi que sur le marquage de photo-affinité de cette protéine par deux sondes photo-activables, la $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{UDPGA}$ et l' $[\text{3H}]\text{acide rétinoïque}$, sont étudiées dans ce travail.

L'activité catalytique vis-à-vis de deux substrats conjugués par l'UGT2B7, l'acide rétinoïque et l'androstérone, est inhibée de la même façon par les trois agents DCCI, EDC et WK. Ce résultat suggère deux hypothèses. 1) Le site actif de l'UDPGA est également modifié par le WK, ce qui explique alors l'inhibition de la glucuronoconjugaison des deux substrats acide rétinoïque et androstérone. 2) Les sites actifs de l'acide rétinoïque et de l'androstérone sont suffisamment proches pour que la modification du site actif de l'acide rétinoïque par le WK empêche à la fois l'accès des substrats acide rétinoïque et androstérone à leur site actif respectif.

Des expériences réalisées avec les deux sondes photo-activables, $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{UDPGA}$ et $[\text{3H}]\text{acide rétinoïque}$, montrent que la modification de l'UGT2B7 par le WK inhibe très fortement l'incorporation sur la protéine de la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{UDPGA}$, qui est un analogue de l'UDPGA, et inhibe également mais beaucoup plus faiblement l'incorporation de $[\text{3H}]\text{acide rétinoïque}$. Ces résultats indiquent que le WK se fixe essentiellement à des résidus acides carboxyliques situés dans le site actif de l'UDPGA, ce qui explique l'inhibition de la conjugaison de substrats autres que l'acide rétinoïque

lorsque l'UGT2B7 est modifiée par le WK. Des acides carboxyliques sont également présents dans le site actif de l'acide rétinoïque, mais ils semblent jouer un rôle moins important dans l'activité catalytique de la protéine.

Des expériences de mutagenèse dirigée sont en cours et nous permettront de distinguer le rôle des acides carboxyliques situés dans le site actif de l'UDPGA et dans le site actif de l'acide rétinoïque.

Nous avons montré que la glucuronoconjugaison de l'acide rétinoïque et de l'androstérone, catalysée par les cellules HK293-UGT2B7 est inhibée par les maléimides. Ce résultat indique le rôle d'acides aminés carboxyliques dans l'activité catalytique de la protéine (site actif de l'UDPGA ou site actif de l'acide rétinoïque). Les expériences de marquage de photo-affinité avec les [β - ^{32}P]5N₃UDPGA et [^3H]acide rétinoïque confirment l'existence de résidus carboxyliques situés prioritairement dans le site actif de l'UDPGA et dans une moindre mesure dans le site actif de l'acide rétinoïque.

A functional role for carboxyl amino acids
of the human liver recombinant UDP-glucuronosyltransferase 2B7

**Nadège Terrier ^a, Piotr Czernik ^b, Guanping Chen ^b, Sylvie Fournel-Gigleux ^a,
Jacques Magdalou ^a and Anna Radomska-Pandya ^b**

^a UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré Nancy I, Vandoeuvre-lès-Nancy (France) and ^b
Department of Biochemistry, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR
(USA)

Abstract

The human liver UDP-glucuronosyltransferase isoform, UGT2B7 catalyzes the glucuronidation of a large variety of compounds, including morphine, steroid hormones and carboxylic acid-containing drugs. The aim of this study was to determine amino acids that are important for the glucuronidation of androsterone and retinoic acid by UGT2B7. Sequence alignment of several UGTs and other proteins such as cytochromes P450 and CRABP that metabolize or interact with these two substrates led to the identification of a highly conserved motif, TSLTKXELEN. This sequence revealed the presence of two glutamyl residues. Carboxylic acid-modifying reagents, carbodimides and *N*-ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonate (Woodward's reagent K) were subsequently used to modify such amino acids. The enzyme was irreversibly inhibited by the reagents which led to pseudo-first order kinetics. The inactivation was protected by UDP-glucuronic acid, but not by the other substrates, androsterone or retinoic acid. The enzyme inactivated by the Woodward's reagent K was protected against the photoincorporation of [β -³²P]-5N₃UDP-glucuronic acid and, at a lower extent, of retinoic acid. These results are in accordance with the presence of carboxyl amino acid residues located at the UDP-glucuronic acid binding site.

Introduction

UDP-glucuronosyltransferases (UGT, EC 2.4.1.17) are a multigenic family of enzymes that catalyze the covalent binding of glucuronic acid from UDP-glucuronic acid on structurally unrelated compounds bearing an hydroxyl, amine, carboxyl or thiol group (Clarke & Burchell, 1994). UGTs are actively involved in the metabolism of drugs and toxic foreign substances, thus leading to water-soluble, generally inactive glucuronides excreted into bile and urine. They also metabolize endogenous compounds, among those are the toxic substance bilirubin or ligands of cytosolic nuclear receptors, steroid hormones and retinoids (Nebert, 1991). UGTs are believed to modulate the concentration of these ligands that are crucial for cellular growth and differentiation.

The isoform UGT2B7 whose cDNA has been cloned and expressed in COS-7 (Jin *et al.*, 1993) presents the capacity to glucuronidate both endogenous compounds and xenobiotics. The substrate specificity of the enzyme is to some extent broad, since compounds with alcohol, phenol and

carboxyl functional groups are accepted by the active site. The widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs of the series of 2-phenylpropionic acid (ketoprofen, ibuprofen, *S*-naproxen), oxazepam and morphine (3- and 6-*O*-glucuronidation) are all good substrates of UGT2B7. On the other hand, this isoform also glucuronidates retinoic acid, steroid hormones (androsterone, estriol) and catechol estrogens (Jin *et al.*, 1993). By the importance of these substances, UGT2B7 would play a key role in drug metabolism and disposition of transcriptional ligands in man.

Two UGT2B7 variants have been described, UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268), which correspond to substitution of tyrosine by histidine at position 268. These proteins, however, did not present marked differences in substrate specificity (Ritter *et al.*, 1990 ; Jin *et al.*, 1993).

This study aims to better understand the molecular basis of the glucuronidation supported by UGT2B7H(268). For this purpose, using amino acid-directed reagents and photoaffinity probes that are analogs of the substrates, retinoic acid and UDP-GlcUA glucuronic acid, we investigated the peptide domains and amino acids that are important for substrate recognition or catalysis. To determine the potential target peptides, sequence alignment of several UGTs, including UGT2B7, and other proteins, such as cytochromes P450 that metabolize steroids has been performed (Fig. 1). Examination of alignments led to the determination of a consensus amino acid sequence, TSLTKXELEN, among these proteins. This motif, which is located on the *N*-terminal end of the UGT isoforms, at position 80 reveals the presence of two glutamic acid residues. We previously reported the crucial importance of carboxylic amino acids of the UGT1A6 isoform after irreversible inactivation by carbodiimides (Battaglia *et al.*, 1994). Therefore, the role of these residues was investigated.

Materials and Methods

Chemicals and reagents

N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide and *N*-ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonate (Woodward's reagent K, WK reagent) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). [³H]-androsterone and [³H]-retinoic acid were from DuPont-New England (Boston, MA). Brij 58, UDP-glucuronic acid (UDP-GlcUA), androsterone and retinoic acid were purchased from Sigma. All other reagents were of the highest grade commercially available.

Membrane fractions of HK293 recombinant cells expressing UGT2B7

The development of HK293 cell line stably expressing the human liver UGT2B7 (H268) has been described previously (Coffman *et al.*, 1998). The recombinant HK293 cell line was grown in medium containing 700 µg geneticin/ml (Gibco-BRL, Eragny, France). Cells were treated with 2 mM *n*-butyric acid (sodium salt, Sigma) 24 h before harvesting. The enriched membrane fractions of the recombinant HK293 cells were obtained from cell homogenate by differential centrifugations, as previously reported (Battaglia *et al.*, 1994). Briefly, pellets of HK293 cells were homogenized in 0.25 M sucrose, 1 mM Hepes (pH 7.4) and subjected to three 10-sec

sonications (550 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific Company, Pittsburg, PA). The homogenate was centrifuged at 10,000 x g for 10 min, and the supernatant at 100,000 x g for 60 min. The resulting pellet was suspended in the same buffer, frozen at -80°C and represented the membrane enriched fraction. No decrease in the enzymatic activity of the recombinant UGT2B7 was observed up to 6 months under these conditions. Protein content was determined by the method of Bradford (1976).

Synthesis of [β -³²P]-5N₃UDP-GlcUA

The photoaffinity probe [β -³²P]-5N₃UDP-GlcUA (2.5 mCi/mmol) was synthesized as previously described (Drake *et al.*, 1991).

Measurement of UGT activity

Androsterone and retinoic acid were used as reporter substrates for the glucuronidation activity supported by UGT2B7, according to the method of Radominska-Pyrek *et al.* (1987). The substrates were mixed with Brij micelles (final concentration of detergent in the reaction mixture, 0.05% w/v). For the assays, the microsomal fractions and recombinant UGT2B7 (15 µg proteins) and the substrates (0.25 mM final concentration) were incubated in a total volume of 60 µl including the following reaction components: 100 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5 or 7.4) for androsterone and retinoic acid, respectively, 5 mM MgCl₂, 0.05% w/v Brij58. Reactions were started by addition of 50 mM UDP-GlcUA (4.17 mM final concentration). The mixtures were incubated for 30 min at 37°C. Controls were performed in which UDP-GlcUA was omitted. The reactions were stopped by 20 µl ethanol and vortexing in ice. The reaction mixture (60 µl) was applied directly to the preadsorbent layer of 19-channeled silica gel TLC plates (Baker 250Si-PA 19C; VWR scientific, Sugarland, TX), dried, and developed once in chloroform/methanol/glacial acetic acid/water (65:25:2:4 v/v). After development, the plates were dried, sprayed with EN³HANCE (DuPont-New England Nuclear), and subjected to autoradiography for 3-7 days at -80°C. Silica gel containing radiolabeled glucuronides and that from the corresponding areas in control lanes were scraped into vials. The radioactivity was determined by liquid scintillation counting (LKB RackBeta 2114; Wallac Inc., Gaithersburg, MD). Specific activity was expressed as pmol or nmol/min.mg protein. Where applicable, means ± SD were reported.

Inactivation of UGT2B7 by carboxyl-specific reagents

The membrane fractions were adjusted to 5.7 mg protein/ml with 50 mM sodium/potassium phosphate buffer (pH 6.0 for inactivation with WK reagent and pH 5.0 for inactivation with carbodiimide derivatives), 5 mM MgCl₂. Dilution of carboxyl-specific reagents were prepared just before use. The WK reagent was diluted in 1 mM HCl. The carbodiimide derivatives were prepared in dimethylsulfoxide. Solvents (2% v/v for experiments with WK reagent and 5% v/v for experiments with carbodiimide derivatives) were shown not to affect the glucuronidation activity. Inactivation experiments were performed at room temperature as follows: inactivation was initiated

by addition of the carboxyl-specific reagents at concentration ranging from 0.2 to 12 mM (depending on the compound used). A control experiment performed with the solvent alone was run simultaneously and corresponded to 100% of activity. Protection against inactivation by WK reagent was also performed by preincubating the proteins in the same conditions with various concentrations of UDP-GlcUA, androsterone and retinoic acid for 5 min at room temperature before incubating with 2 mM WK reagent for 1 min. The chemical modifications were stopped at various periods of time by a 10-fold dilution of the proteins in 180 mM Tris-HCl (pH 6.5 or 7.4), when androsterone or retinoic acid were used, respectively, 28 mM MgCl₂, 5 mM glutamic acid. The glucuronidation activity with androsterone and retinoic acid was determined as described above. The pseudo-first-order rate constants of inactivation (k_i) and the second-order inactivation constant (k'_i) were calculated as previously indicated (Battaglia *et al.*, 1994).

Photoaffinity labeling with [β -³²P]-5N₃UDP-GlcUA and [³H]-retinoic acid

Membrane fractions of UGT2B7 (5.7 mg protein/ml) were incubated with increasing concentrations of WK reagent ranging from 0.5 to 5.0 mM or 1 mM HCl (control, 2% v/v) for 1 min at room temperature. The inactivation was stopped by a 5-fold dilution in ice-cold 180 mM Tris-HCl (pH 7.4), containing 28 mM MgCl₂, and 5 mM glutamic acid. The diluted proteins were then photolabeled with [β -³²P]-5N₃UDP-GlcUA or [³H]-retinoic acid. For the photoaffinity labeling with [β -³²P]-5N₃UDP-GlcUA, the probe (40 mM) was incubated with proteins (50 mg) for 1 min on ice in 180 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer containing 28 mM MgCl₂, followed by irradiation for 30 min with a hand-held UV 366 nm-lamp (UVL-21, Ultraviolet Products). Proteins were processed for sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and run on a 10% w/v acrylamide gel as described (Drake *et al.*, 1992). After electrophoresis, gels were soaked with Autofluor (National Diagnostics, Atlanta, GA) for 30 min in the case of photoaffinity labeling with [³H]-retinoic acid, dried and radiolabeled proteins were visualized by autoradiography for 3-7 days at -80°C.

Sequence similarity between androsterone and retinoic acid-binding proteins

Proteins were individually aligned against UGT2B7 using AIM-Alignment (Huang and Miller, 1991).

Results

Inactivation of UGT2B7 by carboxyl-specific reagents

Fig. 2 shows the concentration dependent inhibition of the glucuronidation of androsterone and retinoic acid by WK, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide and *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. The two activities were concomitantly decreased to the same extent by the three compounds. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide caused the lowest enzyme inhibition. Since the inactivation with the WK reagent occurred rapidly (1 min) by comparison with the two carbodimides (4 to 5 min), the WK reagent was chosen to determine the kinetics of

the inactivation, using androsterone as the glucuronidation substrate (Fig. 3). Fig. 3A shows that the inactivation was time- and concentration dependent, and was characteristic of an irreversible-type inhibition. Plots of the pseudo-first order inactivation rate constants as a function of the WK reagent concentration gave a straight line, and led to the calculation of the second-order inactivation rate constant of and of the order of the reaction n , . This study shows that a carboxyl containing amino acid (aspartic or glutamic acid) was important for the glucuronidation of androsterone and retinoic acid.

Protection of WK-inactivated UGT2B7 by substrates

In order to determine the location of the crucial carboxyl amino acid, inactivation experiment by WK was performed in the presence of the substrates, androsterone, retinoic acid and UDP-GlcUA. Fig. 4 shows that mainly UDP-GlcUA alone or, at a lower extent, the mixture UDP-GlcUA with androsterone or retinoic acid partially protected against the inactivation. No significant protection was observed with androsterone or retinoic acid in the absence of UDP-GlcUA (Fig. 4).

Photoaffinity labeling of WK-inactivated UGT2B7

UGT2B7 inactivated by increasing concentration of WK was photolabeled [β - 32 P]-5N₃UDP-GlcUA (Fig. 5A) or [3 H]-retinoic acid (Fig. 5B). In both cases, a major protein band (52 kDa) was photolabeled, in accordance with the presence of the UGT2B7 isoform. The data indicated that WK strongly and progressively protected against the photoincorporation of [β - 32 P]-5N₃UDP-GlcUA. The protection against photoincorporation of [3 H]-retinoic acid was less effective.

Discussion

By the nature of the substrates, UGT2B7 plays a pivotal role in the biotransformation of exogenous and endogenous compounds. The enzyme has been shown to effectively glucuronidate both drugs (*ca* NSAIDs) and hormones. This behaviour strongly contrasts with that of other isoforms, such as UGT1A6 which glucuronidates planar phenol xenobiotics (Fournel-Gigleux *et al.*, 1991) or UGT1A1 which metabolizes bilirubin, only.

The UGT2B7 isoform is able to glucuronidate structurally unrelated compounds, such as steroids, opioids, retinoids. Both hydroxyl- and carboxyl reactive groups of substrates were accepted, leading to the formation of ether and ester glucuronides, which possess different electrophilicity and reactivity (Jin *et al.*, 1993 ; Coffman *et al.*, 1998). It is therefore likely that the active site presents enough flexibility to accomodate various substances in multiple orientations. This situation allows, however, the interaction of the functional group of the substrate with catalytic amino acid residues.

In this work, we investigated the amino acids which participate to the mechanism of the glucuronidation of two different substrates, androsterone and retinoic acid. These compounds are ligands of nuclear receptors whereby regulating the activity of several genes. Glucuronidation appears as a modulation pathway of their concentration within the cell. They act via specific

interaction with proteins, among those are the receptors and the UGTs themselves. These targets may possess similar peptide domains able to recognize the compounds. Indeed, sequence comparison of several UGTs and cytochromes P450 isoforms that metabolize steroids, as well as CRABP, led to the establishment of a consensus sequence, TSLKXELEN/D. This motif is located on the *N*-terminal end of UGT2B7. We postulated that this peptide region would correspond to the binding site domain of these two substrates. Interestingly, two glutamic acid (E) residues were present in such a sequence. We previously reported the involvement of a carboxyl amino acid in catalysis supported by the human liver UGT1A6 (Battaglia *et al.*, 1994). This isoform glucuronidates planar phenols, such as 1-naphthol, carcinogens of the series of polycyclic arylhydrocarbons, or drugs (paracetamol, naproxen, naftazone) (El Mouehli *et al.*, 1987 ; Herber *et al.*, 1995). This prompted us to determine the possible active role of such amino acid in the glucuronidation reaction using carboxyl-specific reagents. As for UGT1A6, UGT2B7 was strongly sensitive to the inhibitory effect of carbodiimides and the WK reagent. Glucuronidation of androsterone and retinoic acid was inhibited by the reagents at a similar extent, thus indicating that the glutamic acid residue was important for both reactions. Since it is assumed that the binding sites for androsterone and retinoic acid are vicinal, it is suspected that covalent modification of glutamic acid by carbodiimides induced a conformational changes which impaired the glucuronidation of the two substrates.

Location of the carboxyl amino acid residue within the UGT2B7 protein was further investigated by protection experiment against WK-inactivation with substrates of the enzyme. The absence of protection by androsterone or retinoic acid, but the significant protection observed with UDP-GlcUA suggests that the residue is located on the nucleosidic co-substrate binding domain of the protein.

The inactivation of UGT2B7 by WK strongly impaired the photoincorporation [β - ^{32}P]-5N₃UDP-GlcUA, but that of [^3H]-retinoic acid was also affected, although at a weaker extent. The results are in accordance with a presence of a carboxyl amino acid residue located at or near the UDP-GlcUA binding site. Another carboxyl residue less reactive or less accessible would be present on the peptide domain interacting with retinoic acid. It is postulated the glutamic acid residues of the consensus sequence in the *N*-terminal region of UGT2B7 would correspond to such candidate.

Work is in progress to determine, by site-directed mutagenesis, the importance of the glutamic residues of the conserved motif in UGT2B7.

Acknowledgments

Pr. T. Tephly (University of Iowa, IO) is gratefully acknowledged for kindly donating the HK293 recombinant cell line expressing UGT2B7 used in the study.

References

- Battaglia E, Senay C, Fournel-Gigleux S, Herber R, Siest G & Magdalou J *FEBS Lett* **346**:146-150 (1994)
- Bradford MM *Anal Biochem* **72**:248-254 (1976)
- Clarke DJ & Burchell B *Conjugation - deconjugation reactions in drug metabolism and toxicity* FC Kauffman Ed, Springer-Verlag, Berlin, pp 3-44 (1994)
- Coffman BL, King CD, Rios GR & Tephly TR *Drug Metab Dispos* **26**:73-77 (1998)
- Drake RR, Igari I, Lester R, Elbein A & Radomska A *J Biol Chem* **267**:11360-11365 (1992)
- Drake RR, Zimniak P, Haley BE, Lester R, Elbein AD & Radomska A *J Biol Chem* **266**:23257-23260 (1991)
- El Mouelhi M, Ruelius HW, Fenselau C & Dulik DM *Drug Metab Dispos* **15**:767-772 (1987)
- Fournel-Gigleux S, Sutherland L, Sabolovic N, Burchell B & Siest G *Mol Pharmacol* **39**:177-183 (1991)
- Herber R, Hercelin B, Van Cantfort J, De Graeve J, Fournel-Gigleux S, Taguchi T & Magdalou J *Drug Metab Dispos* **23**:1305-1314 (1995)
- Huang X & Miller W *Adv Appl Math* **12**:337-357 (1991)
- Jin C-J, Miners JO, Lillywhite KJ & Mackenzie PI *J Pharmacol Exp Ther* **264**:475-479 (1993)
- Nebert DW *Molec Endocrinol* **5**:1203-1214 (1991)
- Radomska-Pyrek A, Zimniak P, Irshaid YM, Lester R, Tephly TR & Pyrek JS *J Clin Invest* **80**:234-241 (1987)
- Ritter JK, Sheen YY & Owens IS *J Biol Chem* **265**:7900-7906 (1990)

Fig. 1. Sequence alignment of proteins.

The alignments of proteins involved in the metabolism of steroid compounds (A) and of human RAR γ , human CRABP I, rat CRABP II and UGT2B7 (B) were constructed using programs resident in Wisconsin Package Version 10.0 (Genetic Computer Group, Madison, WI). Bold letters indicate identical or homologous amino acids (D = E, I = L = V, S = T).

Fig. 2. Inactivation of UGT2B7 enzyme by carboxyl-specific reagents.

Membrane fractions of HK293 recombinant cells expressing UGT2B7 (5.7 mg protein/ml) were incubated, at 25°C, in 50 mM sodium/potassium phosphate buffer containing 5 mM MgCl₂ with carboxylic-specific reagents (A, WK reagent, 1 min inactivation; B, EDC, 5 min inactivation; C, DCC, 4 min inactivation), at pH 6.0 (WK reagent) or pH 5.0 (EDC and DCC). Glucuronidation reactions were evaluated using retinoic acid (○) or androsterone (●) as substrates as described in *Materials and Methods*.

Fig. 3. Time-dependent inactivation of UGT2B7 enzyme by WK reagent.

(A) Membrane fractions of HK293 recombinant cells expressing UGT2B7 (5.7 mg protein/ml) were incubated, at 25°C, in 50 mM sodium/potassium phosphate buffer (pH 6.0) containing 5 mM MgCl₂, with various concentrations of WK reagent (■, 1 mM; ●, 2 mM; ▲, 4 mM; ◆, 6 mM and □, 9 mM). Inactivations were quenched at the indicated times and the glucuronidation reaction was evaluated as described in *Materials and Methods* using androsterone as a substrate. The residual activity A/A_0 corresponds to the ratio of the activity in the presence of inhibitor, at the time point considered vs the initial activity without inactivator.

(B) Plot of the pseudo-first-order inactivation rate constants as a function of the WK reagent concentration. The slope represents the second-order inactivation rate constant.

Fig. 4. Kinetics of inactivation of UGT2B7 enzyme by WK reagent in the presence of various ligands.

Inactivation (6 mM WK reagent) was performed on membrane fractions of HK293 recombinant cells expressing UGT2B7 (5.7 mg protein/ml), at 25°C, in 50 mM sodium/potassium phosphate buffer (pH 6.0) containing 5 mM MgCl₂, with no ligand (●), 1 mM androsterone (▲), 1 mM retinoic acid (○), 5 mM UDP-GlcUA (◆), 5 mM UDP-GlcUA plus 1 mM androsterone (■), 5 mM UDP-GlcUA plus 1 mM retinoic acid (□). Inactivations were quenched at the indicated times and the glucuronidation reaction was evaluated as described in *Materials and Methods* using androsterone as a substrate. The residual activity corresponds to the ratio of the activity in the presence of inhibitor, at the time point considered vs the initial activity without inactivator.

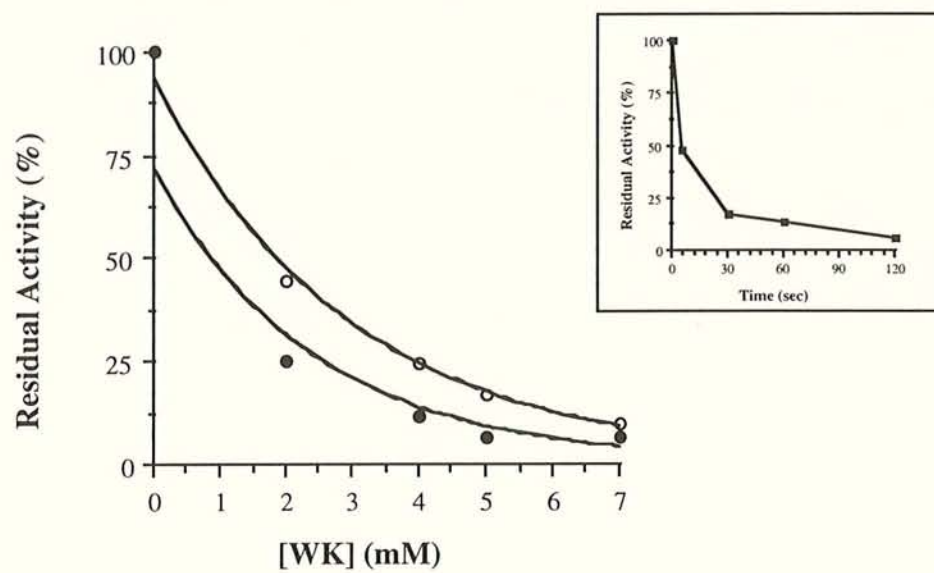
Fig. 5. Effect of the inactivation of UGT2B7 enzyme by WK reagent on the photoincorporation of with [β - 32 P]-5N $_3$ UDP-GlcUA and [3 H]-retinoic acid probes. Membrane fractions of HK293 recombinant cells expressing UGT2B7 (5.7 mg protein/ml) were inactivated, at 25°C, for 1 min, in 50 mM sodium/potassium phosphate buffer (pH 6.0) 5 mM MgCl $_2$, with various concentrations of WK reagent (lanes 1 and 2, 0 mM; lane 3, 0.25 mM, lane 4, 1 mM, lane 5, 2 mM and lane 6, 5 mM). Proteins (50 μ g) were then photolabeled with [β - 32 P]-5N $_3$ UDP-GlcUA (A) or with [3 H]-retinoic acid (B) as described in *Materials and Methods*. Lane 1 is experiment without UV-irradiation. Labeled proteins were separated by SDS-PAGE and followed by autoradiography as described in *Materials and Methods*. The arrows indicate the UGT2B7 enzyme.

Figure 1

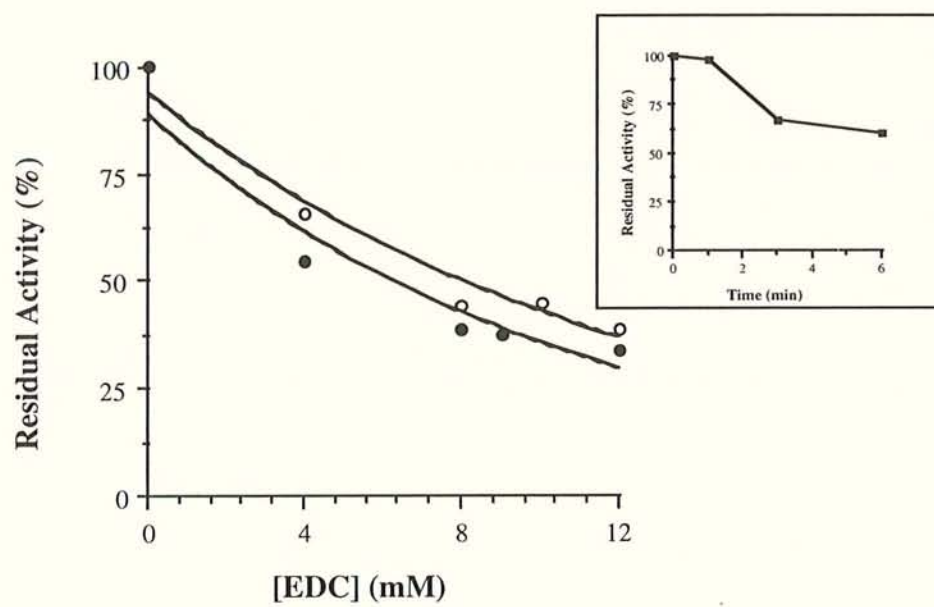
A	Udb8 (human)	SAIKLEVYPTSLTKNYLEDSELLKILDRWI
	Udbf (human)	SAIKLEVYPTSLTKNDLEDSELLKILDRWI
	Udb4 (human)	STLKFEVYPVSLTKTEFEDIHKQLVKRWA
	Udbb (human)	STLKFEVYPVSLTKTEFEDIHKQLVKRWA
	Udba (human)	STLKLEVYPTSLTKTEFENIIMQLVKRLS
	CYP450 iif1 (human)	LLLCSDMLTSLTKLSKEYGSMYTVHLGP
	CYP450 iif2 (mice)	LQLRSQDLLTSLTKLSKEYGSVFTVYLGS
	β-stéroïde déhydrogénase (rat)	IKENFQIFDFSLTKEEMKDIEALNKNVRF
	Udb3 (rat)	PDLKFETFPTSVSKDELENYFIKLVDVWT
	Udb6 (rat)	PDLKFETFPTSVSKDELEKYFIKLADAWT
	Udb2 (rat)	SDLKFEIFSTSISKDELQNHFIKLLDVWT
	Udbc (rat)	SDLKFVTFPTSFSSHDLNFFTRFVNVWT
B	CRABP	SLVKWESENKNVCFQKLLKQFQPKTSW
	UGT2B7 (human)	SALKIEIYPTSLTKTELENFIMQQIKRWS
	consensus	TSLTK-ELEN/D

Figure 2

A



B



C

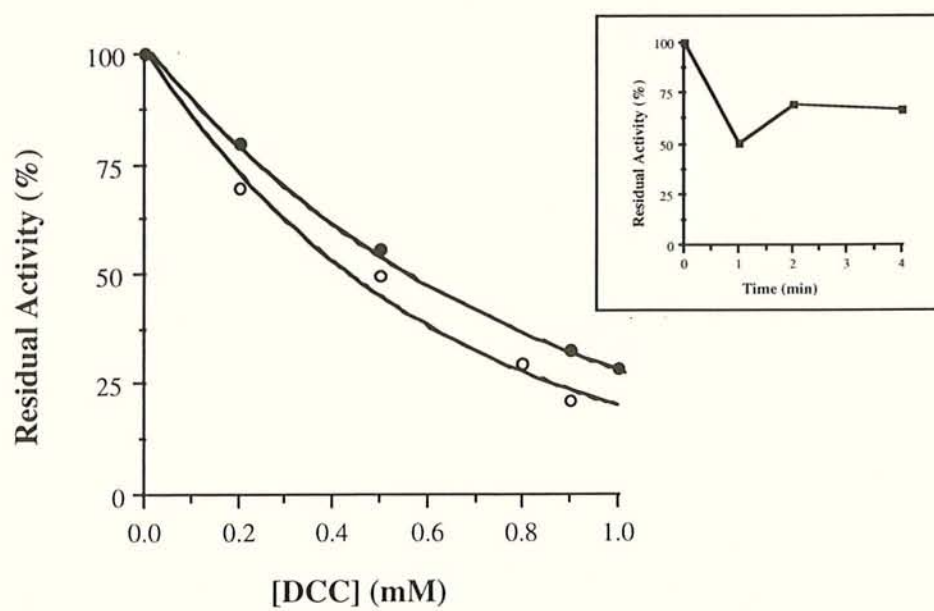


Figure 3

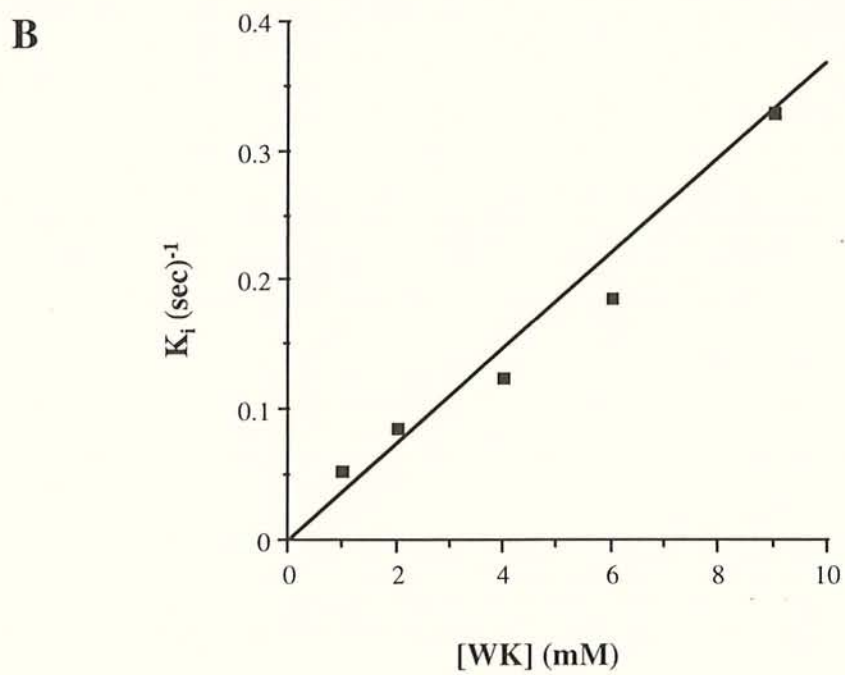
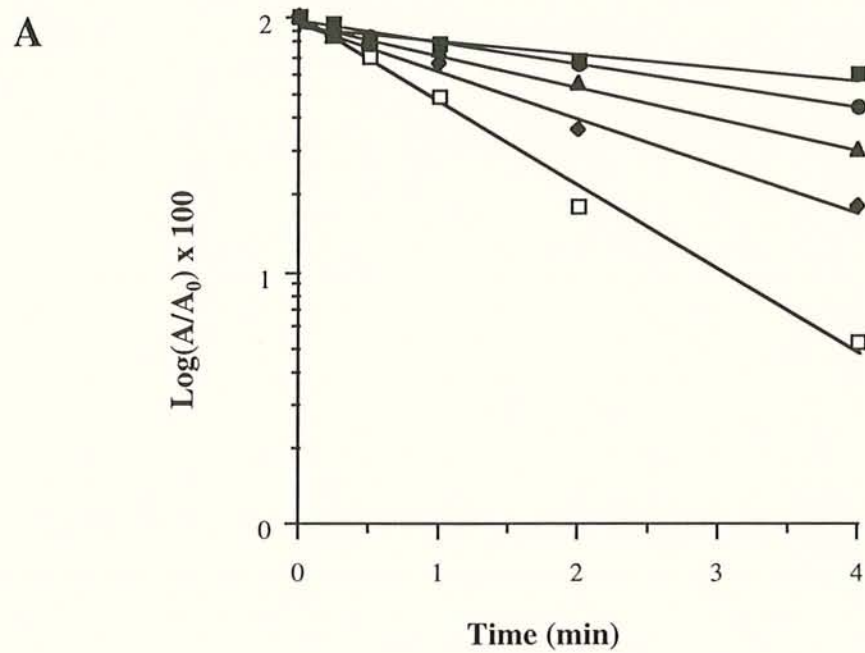


Figure 4

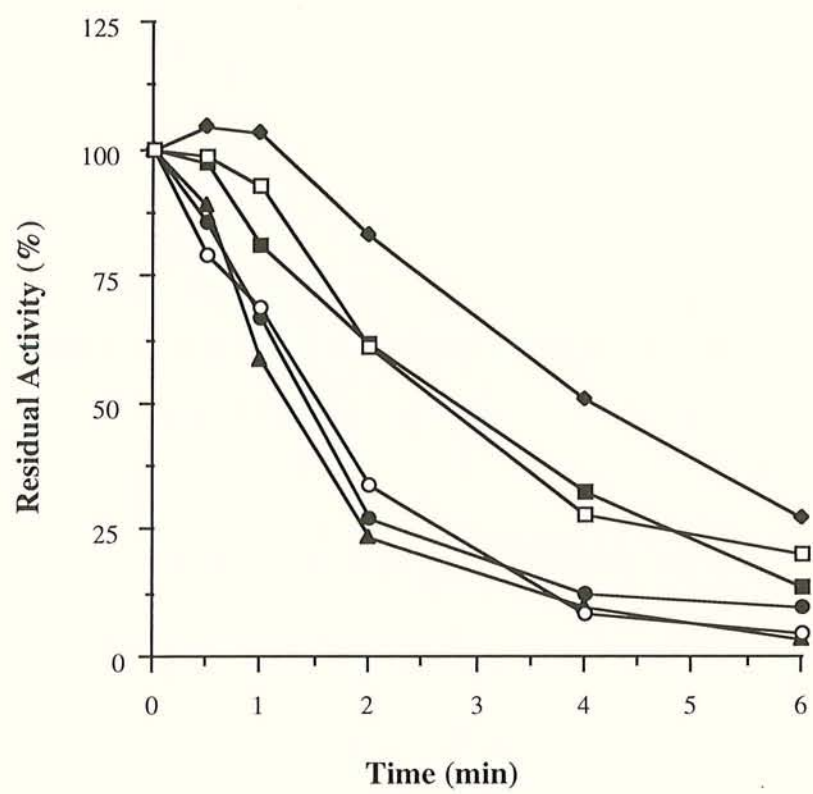
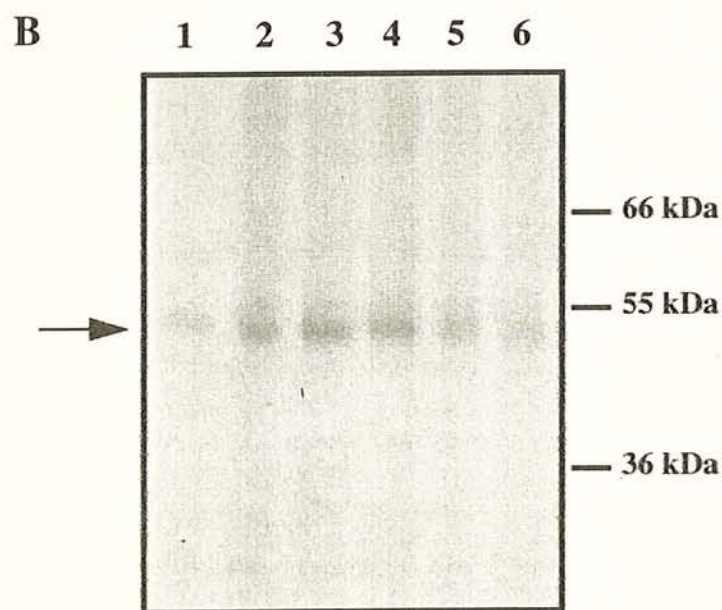
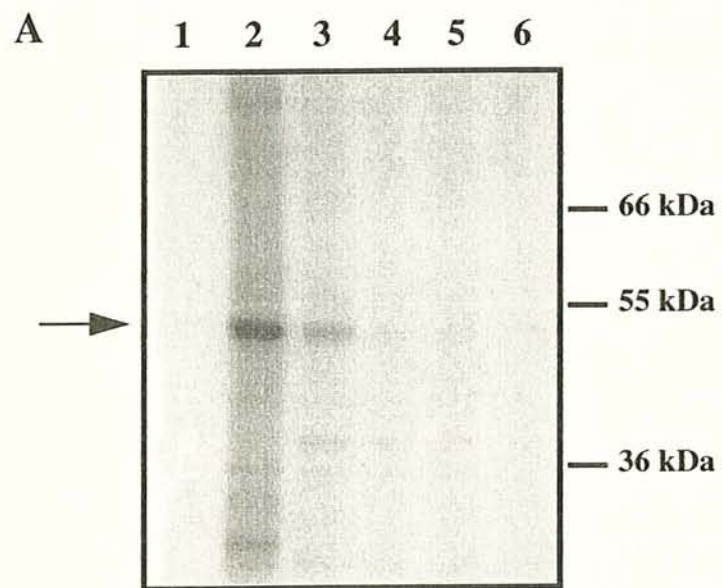


Figure 5



Chapitre 5. Conclusion et perspectives

Chapitre 5. Conclusion et perspectives

Notre travail a porté sur l'analyse des aspects mécanistiques de la réactivité des métabolites d'acides carboxyliques (acylglucuronides et acyl CoA) vis-à-vis de protéines intracellulaires. Nous nous sommes attachés à évaluer les implications biologiques, pharmacologiques et toxicologiques de la réactivité de ces métabolites. Nous nous sommes également intéressés à la caractérisation de la structure et de la fonction d'une isoforme humaine impliquée dans la formation des acylglucuronides, l'UGT2B7.

Ce travail, basé sur une recherche pluridisciplinaire, est le fruit d'un partenariat entre des chimistes, des biochimistes, des biologistes cellulaire et moléculaire et des immunologistes. De multiples techniques ont en effet été mises en œuvre pour mener à terme cette étude.

Ces techniques relèvent de la synthèse chimique et enzymatique d'acylglucuronides, de l'utilisation de cellules recombinantes (cellules en culture et fractions subcellulaires), de la purification de protéines membranaires, de l'utilisation de méthodes immunochimiques, de l'utilisation de sondes photo-activables, de la modification chimique des protéines, de la mutagenèse dirigée et de l'alignement de séquence des protéines.

Plus particulièrement, certains protocoles expérimentaux ont dû être développés spécifiquement pour ce travail.

- ◆ Nous avons réussi à mettre au point une méthode de synthèse chimique du glucuronide de kétoprofène qui nous a permis de produire des quantités d'acylglucuronide supérieures à celles obtenues par synthèse enzymatique au moyen d'UGT immobilisées dans des billes d'alginate.
- ◆ Nous avons élaboré un protocole d'étude spécifique de la réactivité des acylglucuronides qui permet de mettre en évidence dans le même temps la formation des adduits sur des protéines microsomaux et leurs conséquences sur la fonctionnalité de ces protéines.

Nos résultats les plus marquants sont les suivants.

➤ *UGT : cibles protéiques intracellulaires des acylglucuronides.*

Nous avons démontré, pour la première fois, que les UGT sont des cibles protéiques intracellulaires de l'acylglucuronide de kétoprofène.

- ◆ L'argument majeur qui nous a permis de conclure définitivement à ce résultat est la purification des UGT adduites par le glucuronide de kétoprofène à partir de protéines microsomaux incubées avec l'acylglucuronide.
- ◆ Le glucuronide de kétoprofène interagit de manière irréversible avec le site de fixation de l'UDPGA. La liaison covalente de l'acylglucuronide sur les protéines relève à la fois des deux mécanismes, attaque nucléophile et base de Schiff.

- ◆ La formation des adduits est à l'origine d'une inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison catalysée par différentes isoformes d'UGT (UGT1A6, UGT2B1 et UGT2B7).
- ◆ Il nous semble essentiel de déterminer le lien éventuel entre la formation d'adduits avec les UGT et la présence d'auto-anticorps dirigés contre ces protéines, que nous avons détectés chez des patients atteints d'hépatites. *Des travaux prometteurs réalisés avec des cliniciens ont été initiés en ce sens.*

➤ *Métabolites d'acides carboxyliques : à chacun sa réactivité.*

Nous avons montré que les acylglucuronides de divers acides carboxyliques présentent des réactivités différentes vis-à-vis des protéines.

- ◆ Le glucuronide d'acide lithocholique, comme le glucuronide de kétoprofène, se lie de manière covalente au site de fixation de l'UDPGA. La fixation irréversible du glucuronide d'acide lithocholique sur les UGT est à l'origine de l'inhibition immédiate et constante de la glucuronoconjugaison catalysée par différentes isoformes (UGT1A6, UGT2B7).
- ◆ Par ailleurs, le glucuronide d'acide rétinolique tout-*trans* n'est quant à lui pas un inhibiteur de la glucuronoconjugaison. En revanche, ce métabolite interagit avec le site de fixation de l'acide rétinolique tout-*trans* sur les CRABP et pourrait jouer un rôle biologique important en tant que ligand potentiel des récepteurs des rétinoïdes. *Des études ultérieures seront menées pour déterminer une éventuelle interaction du glucuronide d'acide rétinolique tout-*trans* avec les récepteurs nucléaires des rétinoïdes (RAR, RXR) et seront décisives pour cerner le rôle biologique de ces glucuronides.*
- ◆ Nous avons également comparé la réactivité vis-à-vis des UGT de deux métabolites d'un même médicament : le glucuronide de kétoprofène et le kétoprofényle CoA. Ces métabolites sont tous deux à l'origine de l'inhibition de la glucuronoconjugaison mais présentent cependant des réactivités différentes, en terme de cinétiques d'inactivation. Ainsi, plusieurs voies métaboliques semblent impliquées dans la toxicité des médicaments à structure carboxylique. *Il serait intéressant d'établir en parallèle les conséquences de ces deux voies métaboliques dans des systèmes cellulaires plus complexes tels que les hépatocytes de façon à déterminer la contribution de chacun des métabolites dans des phénomènes potentiellement toxiques.*

➤ *UGT2B7 : implication d'acides aminés carboxyliques dans l'organisation du site actif de l'isoforme qui métabolise les acides carboxyliques.*

L'importance de l'identification des isoformes d'UGT impliquées dans la formation des acylglucuronides nous a conduit à caractériser l'UGT2B7 humaine.

- ◆ Nous avons exprimé de manière stable l'ADNc codant pour cette isoforme dans les cellules V79 et nous avons montré qu'elle métabolise les AINS (kétoprofène), l'acide hyodéoxycholique, les hormones stéroïdiennes (androstérone). Des études complémentaires sont en cours pour déterminer la spécificité de cette enzyme vis-à-vis d'autres substrats (acides gras à courte chaîne) et pour

comparer dans les mêmes conditions expérimentales la spécificité de substrats avec d'autres isoformes (UGT1A6, UGT2B4 impliquée dans la conjugaison de l'acide hyodéoxycholique). *Nous envisageons à terme d'évaluer la contribution respective de chacune de ces isoformes dans la conjugaison des substrats carboxyliques au sein de systèmes microsomaux dans lesquels elles sont toutes représentées.*

- ♦ L'investigation de l'organisation du site actif de l'UGT2B7 nous ont amenés à suggérer le rôle d'acides aminés carboxyliques dans l'activité catalytique de l'UGT2B7 vis-à-vis notamment de l'acide rétinoïque tout-trans. *La mutagenèse dirigée d'acides aminés carboxyliques judicieusement choisis devrait nous donner des indications sur leur fonction exacte dans le mécanisme de la catalyse ou dans l'identification du site de fixation de l'acide rétinoïque tout-trans.*

Notre travail a contribué à mieux connaître les mécanismes moléculaires à l'origine de manifestations indésirables survenant avec des médicaments à structure carboxylique.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Agadir A, Cornic M, Lefebvre P, Gourmel B, Balitrand N, Degos L & Chomienne C
Differential uptake of all-*trans* retinoic acid by acute promyelocytic leukemic cells : evidence for its role in retinoic acid efficacy
Leukemia **9**:139-145 (1995)
- Arakawa M, Shimizu F, Sasagawa K, Inomata T & Shinkai K
Antitumor activity of methyl (5-fluoro-1H-2-oxo-4 pyrimidinyl β -D-glucopyranoside) uronate against various experimental tumors
Gann no Rinsho **72**:220-225 (1981)
- Arima N & Kato Y
Species differences in absorption, metabolism and excretion of pranoprofen, a 2-arylpropionic acid derivative, in experimental animals
J Pharmacobio-Dyn **13**:739-744 (1990)
- Bailey MJ & Dickinson RG
Chemical and immunochemical comparison of protein adduct formation of four carboxylate drugs in rat liver and plasma
Chem Res Toxicol **9**:659-666 (1996)
- Banhegyi G, Braun L, Marcolongo P, Csala M, Fulceri R, Mandl J & Benedetti A
Evidence for an UDP-glucuronic acid/ phenol glucuronide antiport in rat liver microsomal vesicles
Biochem J **315**:171-176 (1996)
- Bansal SK & Gessner T
A unified method for the assay of uridine diphosphoglucuronosyltransferase activity toward various aglycones using uridine diphospho[U-¹⁴C]glucuronic acid
Anal Biochem **109**:321-329 (1980)
- Battaglia E, Nowell S, Drake RR, Mizeracka M, Berg CL, Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Gollan JL, Lester R & Radomska A
Two kinetically-distinct components of UDP-glucuronic acid transport in rat liver endoplasmic reticulum
Biochim Biophys Acta **1283**:223-231 (1996)
- Battaglia E, Pritchard M, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Radomska A, Siest G & Magdalou J
Chemical modification of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 by diethyl pyrocarbonate : possible involvement of a histidine residue in the catalytic process
Arch Biochem Biophys **309**:266-272 (1994a)
- Battaglia E & Radomska-Pandya A
A functional role for histidyl residues of the UDP-glucuronic acid carrier in rat liver endoplasmic reticulum membranes
Biochemistry **37**:258-263 (1998)
- Battaglia E, Senay C, Fournel-Gigleux S, Herber R, Siest G & Magdalou J
The chemical modification of human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 reveals the involvement of a carboxyl group in catalysis
FEBS Lett **346**:146-150 (1994b)

- Battaglia E, Terrier N, Mizeracka M, Senay C, Magdalou J, Fournel-Gigleux S & Radominska-Pandya A
Interaction of periodate-oxidized UDP-glucuronic acid with recombinant human liver UDP-glucuronosyltransferase 1A6
Drug Metab Dispos **26**:812-817 (1998)
- Becker B, Barua AB & Olson JA
All-*trans*-retinoyl β -glucuronide : new procedure for chemical synthesis and its metabolism in vitamin A-deficient rats
Biochem J **314**:249-252 (1996)
- Belanger A, Hum DH, Beaulieu M, Levesque E, Guillemette C, Tchernof A, Belanger G, Turgeon D & Dubois S
Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues
J Steroid Biochem Molec Biol **65**:301-310 (1998)
- Belanger G, Beaulieu M, Marcotte B, Levesque E, Guillemette C, Hum D & Belanger A
Expression of transcripts encoding steroid UDP-glucuronosyltransferases in human prostate hyperplasic tissue and the LNCap cell line
J Biol Chem **266**:973-978 (1995)
- Berg C, Radominska A, Lester R & Gollan J
Membrane translocation and regulation of uridine diphosphate-glucuronic acid upake in rat microsomal vesicles
Gastroenterology **108**:183-192 (1995)
- Bernard P, Goudonnet H, Artur Y, Desvergne B & Wahli W
Membrane translocation and regulation of uridine diphosphate-glucuronic acid upake in rat microsomal vesicles
Mol Pharmacol **56**:526-536 (1999)
- Bernstein PS, Choi S-Y, Ho Y-C & Rando RR
Photoaffinity labeling of retinoic acid-binding proteins
Proc Natl Acad Sci (USA) **92**:654-658 (1995)
- Berry BW & Jamali F
Presystemic and systemis chiral inversion of *R*-(-)-fenoprofen in the rat
J Pharmacol Exp Ther **258**:695-701 (1991)
- Bischer A, Zia-Amirhosseini P, Iwaki M, McDonagh A & Benet LZ
Stereoselective binding properties of naproxen glucuronide diastereomers to proteins
J Pharmacokin Biopharm **23**:379-395 (1995)
- Black M & Billing BH
Hepatic bilirubin UDP-glucuronyl transferase activity in liver disease and Gilbert's disease
N Engl J Med **280**:1266-1271 (1969)
- Blaner WS & Olson JA
Retinol and retinoic acid metabolism. In "*The Retinoids : Biology, Chemistry and Medecine, 2nd edition*"
Sporn MB, Roberts AB & Goodman DS Eds, Raven Press, Ltd, New York (1994)
- Bock KW & White INH
UDP-glucuronosyltransferase in perfused rat liver and in microsomes : influence of phenobarbital and 3-methylcholanthrene
Eur J Biochem **46**:451-459 (1974)

Boelsterli UA, Zimmerman HJ & Kretz-Rommel A

Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs : molecular mechanisms and pathology

Crit Rev Toxicol **25**:207-235 (1995)

Bradford MM

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

Anal Biochem **72**:248-254 (1976)

Bretza JA & Novey HS

Anaphylactoid reactions to tolmetin after interrupted dosage

West J Med **143**:55-59 (1985)

Brune K, Beck WS, Geisslinger G, Menzel-Soglowek S, Peskar BM & Pescar BA

Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition

Experientia **47**:257-261 (1991)

Brunelle FM & Verbeeck RK

Glucuronidation of diflunisal by rat liver microsomes. Effect of β -glucuronidase activity

Biochem Pharmacol **46**:1953-1958 (1993)

Brunelle FM & Verbeeck RK

Glucuronidation of diflunisal in liver and kidney microsomes of rat and man

Xenobiotica **26**:123-131 (1996)

Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T & Keppler D

cDNA cloning of hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats

J Biol Chem **271**:15091-15098 (1996)

Burchell B, Brierley CH & Rance D

Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation

Life Sci **57**:1819-1831 (1995)

Burchell B & Coughtrie MWH

UDP-glucuronosyltransferases

Pharmacol Ther **43**:261-289 (1989)

Burchell B, Nebert DW, Nelson DR, Bock KW, Iyanagi T, Jansen PLM, Lancet D, Mulder GJ, Roy Chowdhury J, Siest G, Tephly TR & Mackenzie PI

The UDP-glucuronosyltransferase gene superfamily : suggested nomenclature based on evolutionary divergence

DNA Cell Biol **10**:487-494 (1991)

Caldwell J

Glucuronic acid conjugation in the context of the metabolic conjugation of xenobiotics. In "Advances in glucuronide conjugation"

Matern S, Bock KW, Gerok W Eds, MTP Press (1985)

Carter DC & Ho JX

Structure of serum albumin

Adv Protein Chem **45**:153-203 (1994)

Castillo M & Smith PC

Disposition and reactivity of ibuprofen and ibufenac acyl glucuronides *in vivo* in the rhesus monkey and *in vitro* with human serum albumin

Drug Metab Dispos **23**:566-572 (1995)

Chakir S, Maurice MH, Magdalou J, Leroy P, Dubois N, Lapique F, Abdelhamid Z & Nicolas A

High-performance liquid chromatographic enantioselective assay for the measurement of ketoprofen glucuronidation by liver microsomes

J Chromatogr B **654**:61-68 (1994)

Chen CY & Chen CS

Stereoselective disposition of ibuprofen in patients with renal dysfunction

J Pharmacol Exp Ther **268**:590-594 (1994)

Chen G, Battaglia E, Senay C, Falany CN & Radomska-Pandya A

Photoaffinity labeling probe for the substrate binding site of human phenol sulfotransferase (SULT1A1) : 7-azido-4-methylcoumarine

Prot Sci **8**:2151-2157 (1999)

Christrup LL

Morphine metabolites

Acta Anaesthesiol Scan **41**:116-122 (1997)

Clarke DJ & Burchell B

The uridine diphosphate glucuronosyltransferase multigene family : function and regulation. In "*Conjugation - deconjugation reactions in drug metabolism and toxicity*"

FC Kauffman Ed, Springer-Verlag, Berlin, pp 3-44 (1994)

Coffman BL, King CD, Rios GR & Tephly TR

The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268)

Drug Metab Dispos **26**:73-77 (1998)

Coffman BL, Rios GR & Tephly TR

Purification and properties of two rat liver phenobarbital-inducible UDP-glucuronosyltransferases that catalyze the glucuronidation of opioids

Drug Metab Dispos **24**:329-333 (1996)

Coughtrie MWH, Ask B, Rane A, Burchell B & Hume R

The enantioselective glucuronidation of morphine in rats and humans

Biochem Pharmacol **38**:3273-3280 (1989)

Coughtrie MWH, Burchell B, Leakey JEA & Hume R

The inadequacy of perinatal glucuronidation : immunoblot analysis of the developmental expression of individual UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat and human liver microsomes

Mol Pharmacol **34**:729-735 (1988)

Creech Kraft J, Eckhoff C, Kochhar DM, Bochert G, Chahoud I & Nau H

Isotretinoin (13-*cis*-retinoic acid) metabolism, *cis-trans* isomerization, glucuronidation, and transfer to the mouse embryo : consequences for teratogenicity

Teratogen Carcinogen Mutagen **11**:21-30 (1991)

- Csala M, Banhegyi G, Kardon T, Fulceri R, Gamberucci A, Giunti R, Benedetti A & Mandl J
Inhibition of glucuronidation by an acyl-CoA-mediated indirect mechanism
Biochem Pharmacol **52**:1127-1131 (1996)
- Dansette PM, Bonierbale E, Minoletti C, Beaune PH, Pessayre D & Mansuy D
Drug-induced immunotoxicity
Eur J Drug Metab Pharmacokinet **23**:443-451 (1998)
- Das KK, Basu M, Basu S, Chou DKH & Jungalwala FB
Biosynthesis *in vitro* of GlcAbl3nLcOse4-Cer by a novel glucuronosyltransferase (GlcAT-1) from embryonic chicken brain
J Biol Chem **266**:5238-5243 (1991)
- Deschamps-Labat L
Relations structure-activité des dérivés arylpropioniques anti-inflammatoires non stéroïdiens appliquées à leur liaison aux protéines plasmatiques et à leur liaison aux tissus
Doctorat de l'Université Bordeaux 2 (1997)
- Dickinson RG & King AR
Studies on the reactivity of acyl glucuronides – V. Glucuronide-derived covalent binding of diflunisal to bladder tissue of rats and its modulation by urinary pH and β -glucuronidase
Biochem Pharmacol **46**:1175-1182 (1993)
- Dickinson RG, Kluck RM, Eadie MJ & Hooper WD
Disposition of β glucuronidase-resistant glucuronides of valproic acid after intrabiliary administration in the rat : intact absorption, fecal excretion and intestinal hydrolysis
J Pharmacol Exp Ther **233**:214-221 (1985)
- Ding A, Zia-Amirhosseini P, McDonagh AF, Burlingame AL & Benet LZ
Reactivity of tolmetin glucuronide with human serum albumin - Identification of binding sites and mechanisms of reaction by tandem mass spectroscopy
Drug Metab Dispos **23**:369-376 (1995)
- Draggaci S, Hamar-Hansen C, Fournel-Gigleux S, Lafaurie C, Magdalou J & Siest G
Comparative study of clofibrac acid and bilirubin glucuronidation in human liver microsomes
Biochem Pharmacol **36**:3923-3927 (1987)
- Drake RR, Igari I, Lester R, Elbein A & Radomska A
Application of 5-azido-UDP-glucose and 5-azido-UDP-glucuronic acid photoaffinity probes for the determination of the active site orientation of microsomal UDP-glucosyltransferases and UDP-glucuronosyltransferases
J Biol Chem **267**:11360-11365 (1992)
- Drake RR, Zimniak P, Haley BE, Lester R, Elbein AD & Radomska A
Synthesis and characterization of 5-azido-UDP-glucuronic acid. A new photoaffinity probe for UDP-glucuronic acid-utilizing proteins
J Biol Chem **266**:23257-23260 (1991)
- Dubois N, Lapique F, Maurice MH, Pritchard M, Fournel-Gigleux S, Magdalou J, Abiteboul M, Siest G & Netter P
In vitro irreversible binding of ketoprofen glucuronide to plasma proteins
Drug Metab Dispos **21**:617-623 (1993)

- Dubois-Presle N, Lapicque F, Maurice MH, Fournel-Gigleux S, Magdalou J, Abiteboul M, Siest G & Netter P
Stereoselective esterase activity of human serum albumin towards ketoprofen glucuronide
Mol Pharmacol **47**:647-653 (1995)
- Duran M, Ketting D, van Vossen R, Beckeringh TE, Dorland L, Bruinvis L & Wadman SK
Octanoylglucuronide excretion in patients with a defective oxidation of medium-chain fatty acids
Clin Chim Acta **152**:253-260 (1985)
- Dutton GJ
Glucuronic acid free and combined
New York/London (1966)
- Dutton GJ
Glucuronidation of drugs and other compounds
CRC Press Inc Boca Raton, FL (1980)
- Ebner T & Burchell B
Substrate specificities of two stably expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases
Drug Metab Dispos **21**:50-55 (1993)
- Eliasson E, Gardner I, Hume-Smith H, de Waziers I, Beaune P & Kenna JG
Interindividual variability in P450-dependent generation of neoantigens in halothane hepatitis
Chem Biol Interact **116**:123-141 (1998)
- El Mouelhi M, Ruelius HW, Fenselau C & Dulik DM
Species-dependent enantioselective glucuronidation of three 2-arylpropionic acids : naproxen, ibuprofen and benoxaprofen
Drug Metab Dispos **15**:767-772 (1987)
- Emery P
Clinical implications of selective cyclooxygenase-2 inhibition
Scand J Rheumatol **25 (sup 102)**:23-28 (1996)
- Emi Y, Ikushiro S & Iyanagi T
Drug-responsive and tissue-specific alternative expression of multiple first exons in rat UDP-glucuronosyltransferase family 1 (*UGT 1*) gene complex
J Biochem **117**:392-399 (1995)
- Faed EM
Properties of acyl glucuronides : implications for studies of the pharmacokinetics and metabolism of acidic drugs
Drug Metab Rev **15**:1213-1249 (1984)
- Fears R, Baggaley KH, Alexander R, Morgan B & Hindley RM
The participation of ethyl 4-benzyloxybenzoate (BRL 10894) and other aryl-substituted acids in glycerolipid metabolism
J Lipid Res **19**:3-11 (1978)
- Foster RT & Jamali F
Stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen in the rat. Influence of route of administration
Drug Metab Dispos **16**:623-626 (1988)
- Fournel S & Caldwell J
The metabolic chiral inversion of 2-phenylpropionic acid in rat, mouse and rabbit
Biochem Pharmacol **35**:4153-4159 (1986)

- Fournel-Gigleux S, Hamar-Hansen C, Motassim N, Antoine B, Mothe O, Decolin D, Caldwell J & Siest G
Substrate specificity and enantioselectivity of arylcarboxylic acid glucuronidation
Drug Metab Dispos **16**:627-634 (1988)
- Fournel-Gigleux S, Jackson MR, Wooster R & Burchell B
Expression of a human liver cDNA encoding a UDP-glucuronosyltransferase catalysing the glucuronidation of hyodeoxycholic acid in cell culture
FEBS Lett **243**:119-122 (1989b)
- Fournel-Gigleux S, Shepherd SRP, Carré MC, Burchell B, Siest G & Caubère P
Novel inhibitors and substrates of bilirubin : UDP-glucuronosyltransferases, arylalkylcarboxylic acids
Eur J Biochem **183**, 653-659 (1989a)
- Fournel-Gigleux S, Sutherland L, Sabolovic N, Burchell B & Siest G
Stable expression of two human UDP-glucuronosyltransferases cDNAs in V79 cultures
Mol Pharmacol **39**:177-183 (1991)
- Frances B, Gout R, Campistron G, Panconi E & Cros J
Morphine-6-glucuronide is more mu-selective and potent in analgesis test than morphine
Prog Clin Biol Res **328**:477-480 (1990)
- Georges H, Jarecki I, Netter P, Magdalou J & Lapique F
Glycation of human serum albumin by acylglucuronides of nonsteroidal anti-inflammatory drugs of the series of phenylpropionates
Life Sci **65**:151-156 (1999b)
- Georges H, Jarecki I, Presle N, Buronfosse T, Leroy P, Netter P, Magdalou J & Lapique F
Stereoselective covalent binding of carprofen glucuronide to human serum albumin : characterization of the site and the mechanism
Xenobiotica soumis (1999c)
- Georges H, Presle N, Buronfosse T, Fournel-Gigleux S, Netter P, Magdalou J & Lapique F
Stereoselective degradation of carprofen glucuronide by human serum albumin. Characterisation of sites and reactive amino acids
Chirality sous presse (1999a)
- Gil ML, Ramirez MC, Terencio MC & Castell JV
Immunochemical detection of protein adducts in cultured human hepatocytes exposed to diclofenac
Biochim Biophys Acta **1272**:140-146 (1995)
- Goldman P & Vagelos PR
The specificity of triglycerides synthesis from diglycerides in chicken adipose tissue
J Biol Chem **236**:2620-2625 (1961)
- Gosset RE, Frolov AA, Roths JB, Behnke WD, Kier AB & Schroeder F
Acyl-CoA binding proteins : multiplicity and function
Lipids **31**:895-918 (1996)
- Green MD, King CD, Mojarrabi B, Mackenzie PI & Tephly TR
Glucuronidation of amines and other xenobiotics catalyzed by expressed human UDP-glucuronosyltransferase 1A3
Drug Metab Dispos **26**:507-512 (1998)

Greige-Georges H

Réactivité des glucuronoconjugués avec la sérum albumine humaine. Applications aux anti-inflammatoires non stéroïdiens dérivés de l'acide 2-phénylpropionique

Doctorat de l'Université Henri-Poincaré Nancy 1 (1999)

Hall SD, Hassanzadeh-Khayyat M, Knadler MP & Mayer PR

Pulmonary inversion of 2-arylpropionic acids : influence of protein binding

Chirality 4:349-352 (1992)

Hamdoune M, Mounie J, Magdalou J, Masmoudi T, Goudonnet H & Escousse A

Characterization of the *in vitro* glucuronidation of flurbiprofen enantiomers

Drug Metab Dispos 23:343-348 (1995)

Hamman MA, Thompson GA & Hall SD

Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C

Biochem Pharmacol 54:33-41 (1997)

Hansen AJ, Lee Y-H, Sterneck E, Gonzalez FJ & Mackenzie PI

C/EBP α is a regulator of the UDP glucuronosyltransferase *UGT2B1* gene

Mol Pharmacol 53:1027-1033 (1998)

Hargus SJ, Amouzedeh HR, Pumford NR, Myers TG, McCoy SC & Pohl LR

Metabolic activation and immunochemical localisation of liver protein adducts of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac

Chem Res Toxicol 7:575-582 (1994)

Hargus SJ, Martin BM, George JW & Pohl LR

Covalent modification of rat liver dipeptidyl peptidase IV (CD26) by the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac

Chem Res Toxicol 8:993-996 (1995)

Hashiguchi Y, Molina PE & Abumrad NN

Morphine-3-glucuronide hyperglycemic and neuroendocrine potentiating effects

Brain Res 694:13-20 (1995)

Haumont M, Magdalou J, Lafaurie C, Ziegler JM, Siest G & Colin JN

Phenobarbital inducible UDP-glucuronosyltransferase is responsible for glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine : characterization of the enzyme in human and rat liver microsomes

Arch Biochem Biophys 281:264-270 (1990)

Haumont M, Magdalou J, Ziegler JC, Bidault R, Siest JP & Siest G

Immobilization of microsomes into alginate beads is a convenient method for producing glucuronides from drugs

Appl Microbiol Biotechnol 35:440-446 (1991)

Hayball PJ

Formation and reactivity of acyl glucuronides : the influence of chirality

Chirality 7:1-9 (1995)

Hayball PJ

Chirality and nonsteroidal anti-inflammatory drugs

Drugs 52(Suppl 5):47-58 (1996)

- Hayball PJ, Nation RL & Bochner F
Stereoselective interactions of ketoprofen glucuronides with human plasma protein and serum albumin
Biochem Pharmacol **44**:291-299 (1992)
- Herber R, Hercelin B, Van Cantfort J, De Graeve J, Fournel-Gigleux S, Taguchi T & Magdalou J
Reduction and glucuronidation of naftazone by human and rat liver microsomes
Drug Metab Dispos **23**:1305-1314 (1995)
- Hogeboom GH
Fractionation of cells components of 2 animal tissues : general method for isolation of liver cells components
Methods Enzymol **1**:16-19 (1955)
- Hutt AJ & Caldwell J
The metabolic chiral inversion of 2-arylpropionic acid - a novel route with pharmacological consequences
J Pharmacol Exp Ther **35**:693-704 (1983)
- Iijima H, Fujino T, Minekura H, Suzuki H, Kang MJ & Yamamoto T
Biochemical studies of two acyl-CoA synthetases, ACS1 and ACS2
Eur J Biochem **242**:186-190 (1996)
- Ikushiro S, Emi Y & Iyanagi T
Protein-protein interactions between UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat hepatic microsomes
Biochemistry **36**:7154-7161 (1997)
- Irshaid YM & Tephly TR
Isolation and purification of two human liver UDP-glucuronosyltransferases
Mol Pharmacol **31**:27-34 (1987)
- Iwaki M, Bischer A, Nguyen AC, McDonagh AF & Benet LZ
Stereoselective disposition of naproxen glucuronide in the rat
Drug Metab Dispos **23**:1099-1103 (1995)
- Jamali F, Berry BW, Tehrani MR & Russel AS
Stereoselective pharmacokinetics of flurbiprofen in humans and rats
J Pharm Sci **77**:666-669 (1988)
- Jamali F, Mehvar R & Pasutto FM
Enantioselective aspects of drug action and disposition : therapeutic pitfalls
J Pharm Sci **78**:695-715 (1989)
- Jamison R, Newcomer M & Ong D
Cellular retinoid-binding proteins : limited proteolysis reveals a conformational change upon ligand binding
Biochemistry **33**:2873-2879 (1994)
- Janick-Bruckner D, Barua AB & Olson JA
Induction of HL-60 cell differentiation by water-soluble and nitrogen containing conjugates of retinoic acid and retinol
FASEB J **5**:320-325 (1991)
- Jin C-J, Miners JO, Lillywhite KJ & Mackenzie PI
Complementary deoxyribonucleic acid cloning and expression of human liver uridine diphosphate-glucuronosyltransferase glucuronidating carboxylic acid-containing drugs
J Pharmacol Exp Ther **264**:475-479 (1993)

- Keglevic D, Pravdic N & Tomasic J
 Glucuronic esters. Part IV. Synthesis of 1-*O*-acyl-D-glucopyranuronic acids via benzyl 1-*O*-acyl-2, 3, 4,-tri-*O*-benzyl-D-glucopyranuronates
J Chem Soc :511-514 (1968)
- Kemal C & Casida JE
 Coenzyme A esters of 2-aryloxyphenoxypropionate herbicides and 2-arylpropionate antiinflammatory drugs are potent and stereoselective inhibitors of rat liver acetyl-CoA carboxylase
Life Sci **50**:533-540 (1992)
- King AR & Dickinson RG
 Studies on the reactivity of acyl glucuronides-IV. Covalent binding of diflunisal to tissues of the rat
Biochem Pharmacol **45**:1043-1047 (1993)
- King AR & Dickinson RG
 The utility of the bile-exteriorized rats as a source of reactive acyl glucuronides : studies with zomepirac
J Pharmacol Toxicol Methods **36**:131-136 (1996)
- King CD, Rios GR, Green MD, Mackenzie PI & Tephly TR
 Comparison of stably expressed rat UGT1.1 and UGT2B1 in the glucuronidation of opioid compounds
Drug Metab Dispos **25**:251-255 (1997)
- Knadler MP & Hall SD
 High-liquid performance chromatographic analysis of the enantiomers of flurbiprofen and its metabolites in plasma and urine
J Chromatogr **494**:173-182 (1989)
- Knadler MP & Hall SD
 Stereoselective hydrolysis of flurbiprofen conjugates
Drug Metab Dispos **19**:280-282 (1991)
- Knihinicki RD, Day RO & Williams KM
 Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-seroidal anti-inflammatory drugs-II Racemization and hydrolysis of (*R*)- and (*S*)-ibuprofen-CoA thioesters
Biochem Pharmacol **42**:1905-1911 (1991)
- Krcmery M & Zakim D
 Effects of oleoyl-CoA on the activity and functional state of UDP-glucuronosyltransferase
Biochem Pharmacol **46**:897-904 (1993)
- Kretz-Rommel A & Boelsterli UA
 Selective protein adducts to membrane proteins in cultured rat hepatocytes exposed to diclofenac : radiochemical and immunochemical analysis
Mol Pharmacol **45**:237-244 (1994)
- Kroemer HK & Klotz U
 Glucuronidation of drugs : a re-evaluation of the pharmacological significance of the conjugates and modulating factors
Clin Pharmacokinet **23**:292-310 (1992)
- Kuenzle CC, Maier C & Ruttner JR
 The nature of four bilirubin fractions from serum and of three bilirubin fractions from bile
J Lab Clin Med **67**:294-306 (1966)

- Kuhara T, Matsumoto I, Ohno M & Ohura T
Identification and quantification of octanoyl glucuronide in the urine of children who ingested medium-chain triglycerides
Biomed Environ Mass Spectrom **13**:595-598 (1986)
- Laemmli UK
Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4
Nature **227**:680-685 (1970)
- Lavau C & Dejean A
The t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia
Leukemia **8**:1615-1621 (1994)
- Lazard D, Zupko K, Poria Y, Nef P, Lazarovit J, Horn S, Khen M & Lancet D
Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase
Nature **349**:790-793 (1991)
- Lecoeur S & Beaune PH
Tienilic acid-induced autoimmune hepatitis : characterization of the autoantigenic sites on P450 2C9
14th European Workshop on Drug Metabolism of the European Society for Biochemical Pharmacology, Paris, France (1994)
- Lee EJD, Williams K, Day R, Graham G & Champion D
Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man
Brit J Pharmacol **19**:669-674 (1985)
- Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D & Hwang D
Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide
J Biol Chem **267**:25934-25938 (1992)
- Lilienblum W, Walli AK & Bock KW
Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various inducing agents
Biochem Pharmacol **31**:907-913 (1982)
- Lind T, Lindahl U & Lidholt K
Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. Identification of a 70-kDa protein catalysing both the Q-glucuronosyl- and the N-acetyl-D-glucosaminyltransferase reactions
J Biol Chem **268**:20705-20708 (1993)
- Little JM, Drake RR, Vonk R, Kuipers F, Lester R & Radomska A
Characterization of human liver microsomal UDP-glycosyltransferases using photoaffinity analogs
J Pharm Exp Ther **273**:1551-1559 (1995)
- Liu JH, Malone RS, Stallings H & Smith PC
Influence of renal failure in rats on the disposition of salicyl acyl glucuronide and covalent binding of salicylate to plasma proteins
J Pharmacol Exp Ther **278**:277-283 (1996)
- Loewen GR, Herman RJ, Ross SG & Verbeek RK
Effect of dose on the glucuronidation and sulfation kinetics of diflunisal in man : single dose studies
Br J Clin Pharmacol **26**:31-39 (1988)

- Lohnes D, Dierich A, Ghyselinck N, Kastner P, Lampron C, Lemeur M, Lufkin T, Mendelsohn C, Nakshatri H & Chambon P
Retinoid receptors and binding proteins
J Cell Sci **16**:69-76 (1992)
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ
Protein measurement with the Folin phenol reagent
J Biol Chem **193**:265-275 (1951)
- Mackenzie PI
Expression of chimeric cDNAs in cell culture defines a region of UDP-glucuronosyltransferase involved in substrate selection
J Biol Chem **265**:3432-3435 (1990)
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Roy-Chowdhury J, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KK & Nebert DW
The UDP glycosyltransferase gene superfamily : recommended nomenclature update based on evolutionary divergence
Pharmacogenetics **7**:255-269 (1997)
- Mackenzie PI, Rodbourne L & Stanks S
Steroid UDP glucuronosyltransferases
J Steroid Biochem **43**:1099-1105 (1992)
- Mackenzie PI, Roy Chowdhury N & Roy Chowdhury J
Characterisation and regulation of rat liver UDP-glucuronosyltransferases
Clin Exp Pharmacol Physiol **16**:501-504 (1989)
- Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Pritchard M & Siest G
Peroxisome proliferators as inducers and substrates of UDP-glucuronosyltransferases
Biol Cell **77**:13-19 (1993)
- Maire-Gauthier R, Buronfosse T, Magdalou J, Herber R, Besse S, Delatour P & Benoit E
Species-dependent enantioselective glucuronidation of carprofen
Xenobiotica **28**:595-604 (1998)
- Manns MP & Obermayer-Straub P
Cytochromes P450 and uridine diphosphate-glucuronosyltransferases : model autoantigens to study drug-induced, virus-induced, and autoimmune liver disease
Hepatology **26**:1054-1066 (1997)
- Manoukian AV & Carson JL
Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatic disorders : incidence and prevention
Drug Safety **15**:64-71 (1996)
- Mazoit JX, Sandouk P, Scherrmann JM & Roche A
Extrahepatic metabolism of morphine occurs in humans
Clin Pharmacol Ther **48**:613-618 (1990)

McKinnon GE & Dickinson RG

Covalent binding of diflunisal and probenecid to plasma protein in humans : persistence of the adducts in the circulation.

Res Com Chem Path Pharmacol **66**:339-354 (1989)

Meade EA, Smith WL & DeWitt DL

Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs

J Biol Chem **268**:6610-6614 (1993)

Meech R & Mackenzie R

UDP-glucuronosyltransferase, the role of the amino terminus in dimerization

J Biol Chem **272**:26913-26917 (1997)

Meech R & Mackenzie R

Determinants of UDP glucuronosyltransferase membrane association and residency in the endoplasmic reticulum

Arch Biochem Biophys **356**:77-85 (1998)

Meffin PJ, Zilm DM & Veenendaal JR

Reduced clofibril acid clearance in renal dysfunction is due to a futile cycle

J Pharmacol Exp Ther **227**:732-738 (1983)

Mehta RG, Barua AB, Olson JA & Moon RC

Effects of retinoid glucuronides on mammary gland development in organ culture

Oncology **48**:505-509 (1991)

Miller DA & Deluca HF

Biosynthesis of retinoyl- β -glucuronide, a biologically active metabolite of all-*trans*-retinoic acid

Arch Biochem Biophys **244**:179-186 (1986)

Miners JO & Mackenzie PI

Drug glucuronidation in humans

Pharmac Ther **51**:347-369 (1991)

Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ & Vane JR

Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase

Proc Natl Acad Sci USA **90**:11693-11697 (1993)

Mojarrabi B, Butler R & Mackenzie PI

cDNA cloning and characterization of the human UDP-glucuronosyltransferase, UGT1A3

Biochem Bioph Res Co **225**:785-790 (1996)

Mulder GJ

Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs

Ann Rev Pharmacol Toxicol **32**:25-49 (1992)

Mulder GJ, Coughtrie MWH & Burchell B

Glucuronidation. In "Conjugation reactions in drug metabolism : an integrated approach"

GJ Mulder (Ed) Taylor & Francis, Londres, pp 51-105 (1990)

- Muller N, Payan E, Lopicque F, Bannwarth B & Netter P
Pharmacological aspects of chiral nonsteroidal anti-inflammatory drugs
Fund Clin Pharmacol **4**:617-634 (1990)
- Munafò A, McDonagh AF, Smith PC & Benet LZ
Irreversible binding of tolmetin glucuronic acid esters to albumin *in vitro*
Pharmaceut Res **7**:21-27 (1990)
- Nakamura Y & Yamaguchi T
Stereoselective metabolism of 2-phenylpropionic acid in rat. II. Studies on the organs responsible for the optical isomerization of 2-phenylpropionic acid in rat *in vivo*
Drug Metab Dispos **15**:535-539 (1987)
- Nakamura Y, Yamaguchi T, Takahashi S, Hashimoto S, Iwatani K & Nakagawa Y
Optical isomerisation mechanism of (-)-R-hydratropic acid derivatives
J Pharmacobio Dyn **4**:S1 (1981)
- Napoli JL
Retinoic acid biosynthesis and metabolism
FASEB J **10**:993-1001 (1996)
- Nebert DW
Proposed role of drug-metabolizing enzymes : regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions
Molec Endocrinol **5**:1203-1214 (1991)
- Neupert W, Brugger R, Euchenhofer C, Brune K & Geisslinger G
Effects of ibuprofen enantiomers and its coenzyme A thioesters on human prostaglandin endoperoxide synthases
Br J Pharmacol **122**:487-492 (1997)
- Ojingwa J, Spahn H & Benet LZ
Studies of tolmetin reversible and irreversible binding to proteins via its glucuronide conjugate
Pharm Res **5**:S214 (1988)
- Ojingwa JC, Spahn-Langguth H & Benet LZ
Reversible binding of tolmetin, zomepirac, and their glucuronide conjugates to human serum albumin and plasma
J Pharmacokinet Biopharm **22**:19-40 (1994a)
- Ojingwa JC, Spahn-Langguth H & Benet LZ
Irreversible binding of tolmetin to macromolecules *via* its glucuronide : binding to blood constituents, tissue homogenates and subcellular fractions *in vitro*
Xenobiotica **24**:495-506 (1994b)
- Ouzzine M & Fournel-Gigleux S
An internal signal sequence mediates the targeting and retention of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A6 to the endoplasmic reticulum
J Biol Chem **274**:31401-31409 (1999a)
- Ouzzine M, Magdalou J, Burchell B & Fournel-Gigleux S
Expression of a functionally active human hepatic UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A6) lacking the N-terminal signal sequence in the endoplasmic reticulum
FEBS Lett **454**:187-191 (1999b)

- Ouzzine M, Pillot T, Fournel-Gigleux S, Magdalou J, Burchell B & Siest G
Expression and role of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 analyzed by specific antibodies raised against a hybrid protein produced in *Escherichia coli*
Arch Biochem Biophys **310**:196-204 (1994)
- Panfil I, Lehman PA, Zimniak P, Ernst B, Franz T, Lester R & Radomska A
Biosynthesis and chemical synthesis of carboxyl-linked glucuronide of lithocholic acid
Biochim Biophys Acta **1126**:221-228 (1992)
- Park BK & Kitteringham NR
Drug-protein conjugation and its immunological consequences
Drug Metab Rev **22**:87-144 (1990)
- Patel M, Tang BK, Grant DM & Kalow W
Interindividual variability in the glucuronidation of (S) oxazepam contrasted with that of (R) oxazepam
Pharmacogenetics **5**:287-297 (1995)
- Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, Alex B, Straub P, Lamb JG, Johnson EF, Tukey RH & Manns MP
Recognition of uridine diphosphate glucuronosyltransferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D
Lancet **344**:578-581 (1994)
- Pillot T, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Lafaurie C, Tebbi D, Treat S, Radomska A, Lester R, Siest G & Magdalou J
Determination of the human liver UDP-glucuronosyltransferase 2B4 domains involved in the binding of UDP-glucuronic acid using photoaffinity labeling of fusion proteins
Biochem Biophys Res Commun **197**:785-791 (1993)
- Populaire P, Terlain B, Pascal S, Decouvelaere B, Renard A & Thomas JP
Comportement biologique : taux sériques, excrétion et biotransformation de l'acide (benzoyl-3-phényl)-2-propionique ou kétoprofène chez l'animal et l'homme
Ann Pharm Fr **31**:735-749 (1973)
- Prehm P
Inhibition of hyaluronate synthesis
Biochem J **225**:699-705 (1985)
- Presle N, Lapique F, Fournel-Gigleux S, Magdalou J & Netter P
Stereoselective irreversible binding of ketoprofen glucuronides to albumin
Drug Metab Dispos **24**:1050-1057 (1996)
- Pritchard M, Fournel-Gigleux S, Siest G, Mackenzie P & Magdalou J
A recombinant phenobarbital-inducible rat liver UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B1) stably expressed in V79 cells catalyses the glucuronidation of morphine, phenols and carboxylic acids
Mol Pharmacol **45**:42-50 (1994)
- Priymenko N, Garnier F, Ferre J-P, Delatour P & Toutain P-L
Enantioselectivity of the enterohepatic recycling of carprofen in the dog
Drug Metab Dispos **26**:170-176 (1998)
- Pumford NR, Myers TG, Davila JC, Highet RJ & Pohl LR
Immunochemical detection of liver protein adducts of the nonsteroidal antiinflammatory drug diclofenac
Chem Res Toxicol **6**:147-150 (1993)

- Radomska-Pyrek A, Zimniak P, Chari M, Golunski E, Lester R & Pyrek JS
Glucuronides of monohydroxylated bile acids : specificity of microsomal glucuronosyltransferase for the glucuronidation site, C-3 configuration, and side chain lenght
J Lipid Res **27**:89-100 (1986)
- Radomska-Pyrek A, Zimniak P, Irshaid YM, Lester R, Tephly TR & Pyrek JS
Glucuronidation of 6 alpha-hydroxy bile acids by human liver microsomes
J Clin Invest **80**:234-241 (1987)
- Rasmussen JT, Rosendal J & Knudsen J
Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor
Biochem J **292**:907-913 (1993)
- Reed RG, Davidson LK, Burrington CM & Peters T
Non-resolving jaundice : bilirubin covalently attached to serum albumin circulates with the same metabolic half-life as albumin
Clin Chem **34**:1992-1994 (1988)
- Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT & Owens IS
A novel complex locus *UGT1* encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes with identical carboxyl termini
J Biol Chem **267**:3257-3261 (1992)
- Ritter JK, Crawford JM & Owens IS
Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells
J Biol Chem **266**:1042-1047 (1991)
- Ritter JK, Sheen YY & Owens IS
Cloning and expression of human liver UDP-glucuronosyltransferase in COS-1cells
J Biol Chem **265**:7900-7906 (1990)
- Rubin A, Warrick P, Wolen RL, Chernish SM, Ridolfo AS & Gruber CM
Physiological disposition of fenoprofen in man. III. Metabolism and protein binding of fenoprofen
J Pharmacol Exp Ther **183**:449-457 (1972)
- Rudy AC, Liu Y, Brater DC & Hall SD
Stereoselective pharmacokinetics and inversion of R ketoprofen in healthy volunteers
J Clin Pharmacol **38**:3S-10S (1998)
- Ruelius HW, Kirkman SK, Young EM & Jansen FW
Reactions of oxaprozin-1-O-acylglucuronide in solutions of plasma and albumin
Adv Exp Med Biol **197**:431-441 (1986)
- Ruelius HW, Young EM, Kirkman SK, Schillings RT, Sisenwine SF & Janssen FW
Biological fate of acyl glucuronides in the rat. The role of rearrangement, intestinal enzymes and reabsorption
Biochem Pharmacol **34**:451-452 (1985)
- Sallustio BC, Meffin PJ & Knights KM
The stereospecific incorporation of fenoprofen into rat hepatocyte and adipocyte triacylglycerols
Biochem Pharmacol **37**:1919-1923 (1988)

- Salyers KL, Cullum ME & Zile MH
Glucuronidation of all-*trans*-retinoic acid in liposomal membranes
Biochim Biophys Acta **1152**:328-334 (1993)
- Samokyszyn VM, Gall WE, Zawada G, Freyaldenhoven MA, Chen G & Radomska-Pandya A
Soumis (1999)
- Samuel SA
Apparent anaphylactic reaction to zomepirac (Zomax)
N Engl J Med **304**:978 (1981)
- Sani BP, Barua AB, Hill D, Shih TW & Olson JA
Retinoyl β -glucuronide : lack of binding to receptor proteins of retinoic acid as related to biological activity
Biochem Pharmacol **43**:919-922 (1992)
- Sass JO, Forster A, Bock KW & Nau H
Glucuronidation and isomerization of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid by liver microsomes of phenobarbital- or 3-methylcholanthrene-treated rats
Biochem Pharmacol **47**:485-492 (1994)
- Scholz H & Schmitz W
Positive inotropic effects of digitoxin and digitoxin-glucuronide in human isolated ventricular heart muscle preparations
Basic Res Cardiol **79**(Suppl):134-139 (1984)
- Schwartentruber MS & Harris RA
Inhibition of metabolic processes by coenzyme-A-sequestering aromatic acids. Prevention by para-chloro- and para-nitrobenzoic acids
Biochem Pharmacol **36**:3147-3153 (1987)
- Segel IH
Enzyme kinetics
New York (1975)
- Senay C, Battaglia E, Chen G, Breton R, Fournel-Gigleux S, Magdalou J & Radomska-Pandya A
Photoaffinity labeling of the aglycon binding site of the recombinant human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 with 7-azido-4-methylcoumarin
Arch Biochem Biophys **368**:75-84 (1999)
- Senay C, Ouzzine M, Battaglia E, Pless D, Cano V, Burchell B, Radomska A, Magdalou J & Fournel-Gigleux S
Arginine 52 and histidine 54 located in a conserved amino-terminal hydrophobic region (LX2-R52-G-H54-X3-V-L) are important amino acids for the functional and structural integrity of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6
Mol Pharmacol **51**:406-413 (1997)
- Shen SJ, Hargus SJ, Martin BM & Pohl LR
Cytochrome P450 2C11 is a target of diclofenac covalent binding in rats
Chem Research Toxicol **10**:420-423 (1997)
- Shen S, Marchick MR, Davis MR, Doss GA & Pohl LR
Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4 : role of 5-hydroxydiclofenac
Chem Res Toxicol **12**:214-222 (1999)

- Singh G, Ramey DR, Morpheld D & Fries JF
Comparative toxicity of non-steroidal anti-inflammatory agents
Pharmacol Therapeut **62**:175-191 (1994)
- Smith PC, Benet LZ & McDonagh AF
Irreversible binding of zomepirac to plasma protein *in vitro* and *in vivo*
J Clin Invest **77**:934-939 (1986)
- Smith PC, Benet LZ & McDonagh AF
Covalent binding of zomepirac glucuronide to proteins : evidence for a Schiff base mechanism
Drug Metab Dispos **18**:639-644 (1990)
- Smith PC, Hasegawa J, Langendijk PNJ & Benet LZ
Stability of acyl glucuronides in blood, plasma and urine : studies with zomepirac
Drug Metab Dispos **13**:110-112 (1985)
- Smith PC & Liu JH
Covalent binding of suprofen to renal tissue of rat correlates with excretion of its acyl glucuronide
Xenobiotica **25**:531-540 (1995)
- Smith PC, Song WQ & Rodriguez RJ
Covalent binding of etodolac acyl glucuronide to albumin *in vitro*
Drug Metab Dispos **20**:962-965 (1992)
- Sokolove PM, Wilcox MA & Thurman RG
Stimulation of hepatic microsomal β -glucuronidase by calcium
Biochem Biophys Res Commun **121**:987-993 (1984)
- Solomon DH & Gurwitz JH
Toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the elderly : is advanced age a risk factor?
Am J Med **102**:208-215 (1997)
- Spahn H, Iwakawa S, Lin ET & Benet LZ
Procedures to characterize *in vivo* and *in vitro* enantioselective glucuronidation properly : studies with benoxaprofen glucuronides
Pharm Res **6**:125-132 (1989a)
- Spahn H, Nathke I, Mohri K, Zia-Amirhosseini P & Benet LZ
Preliminary characterization of proteins to which benoxaprofen glucuronide binds irreversibly
Pharm Res **7**:S257 (1990)
- Spahn H, Spahn I & Benet LZ
Probenecid-induced changes in the clearance of carprofen enantiomers : a preliminary study
Clin Pharm Ther **45**:500-505 (1989b)
- Spahn-Langguth H & Benet LZ
Acyl glucuronides revisited : is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism?
Drug Metab Rev **24**:573-577 (1992)
- Sperker B, Backman JT & Kroemer HK
The role of β -glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans
Clin Pharmacokinet **33**:18-31 (1997)

- Srinivasan V, Wielbo D, Simpkins J, Karlix J, Sloan K & Tebbett I
Analgesic and immunomodulatory effects of codeine and codeine 6-glucuronide
Pharm Res **13**:296-300 (1996)
- Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP & Tukey RH
Differential expression of the *UGT1A* locus in human liver, biliary, and gastric tissue : identification of *UGT1A7* and *UGT1A10* transcripts in extrahepatic tissue
Mol Pharmacol **52**:212-220 (1997)
- Suleman FG, Abid A, Gradinaru D, Daval JL, Magdalou J & Minn A
Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes
Arch Biochem Biophys **358**:63-67 (1998)
- Takikawa H, Minagawa K, Sano S & Yamanaka M
Lithocholate-3-O-glucuronide-induced cholestasis. A study with congenital hyperbilirubinemic rats and effects of ursodeoxycholate conjugates
Dig Dis Sci **38**:1543-1548 (1993)
- Tallman MS & Wiernick PH
Retinoids in cancer treatment
J Clin Pharmacol **32**:868-888 (1992)
- Tanaka Y, Shimomura Y, Hirota T, Nozaki A, Ebata M, Takasaki W, Shigehara E, Hayashi R & Caldwell J
Formation of glycine conjugate and (-)-(R)-enantiomer from (+)-(S)-2-phenylpropionic acid suggesting the formation of the CoA thioester intermediate of (+)-(S)-enantiomer in dogs
Chirality **4**:342-348 (1992)
- Tardy B, Page Y, Guy C, Comtet C, Thevenet D, Bertrand M & Bertrand JC
Anaphylactic shock induced by ketoprofen
Therapie **44**:68 (1989)
- Tephly TR & Burchell B
UDP-glucuronosyltransferases : a family of detoxifying enzymes
Trends Pharmacol Sci **11**:276-279 (1990)
- Terrier N, Benoit E, Senay C, Lapicque F, Radomska-Pandya A, Magdalou J & Fournel-Gigleux S
Human and rat liver UDP-glucuronosyltransferases are targets of ketoprofen acylglucuronide
Mol Pharmacol **56**:226-234 (1999)
- Tracy T & Hall SD
Metabolic inversion of (R)-ibuprofen. Epimerization and hydrolysis of ibuprofenyl-coenzyme A
Drug Metab Dispos **20**:322-327 (1992)
- Tukey RH, Pendurthi UR, Nguyen NT, Green MD & Tephly TR
Cloning and characterization of rabbit liver UDP-glucuronosyltransferase cDNAs. Developmental and inducible expression of 4-hydroxybiphenyl UGT2B13
J Biol Chem **268**:15260-15266 (1993)
- Vainio H, Elovaara E, Luukkanen L, Antilla S, Ulmanen I, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M, Pillot T & Magdalou J
Expression and co-induction of CYP1A1 and UGT1*6 in human lungs
Eur J Metabol Pharmacokin **20**:47-48 (1995)

- Van Breemen RB & Fenselau C
Acylation of albumin by 1-O-acyl glucuronides
Drug Metab Dispos **13**:318-320 (1985)
- Vecchini F, Mace K, Magdalou J, Mahe Y, Bernard BA & Shroot B
Constitutive and inducible expression of drug metabolizing enzymes in cultured human keratinocytes
Brit J Dermatol **32**:14-21 (1995)
- Verbeeck RK, Blackburn JL & Loewen GR
Clinical pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory drugs
Clin Pharmacokinet **8**:297-331 (1983)
- Verbeeck RK, Wallace SM, Loewen GR
Reduced elimination of ketoprofen in the elderly is not necessarily due to impaired glucuronidation
Br J Clin Pharmacol **17**:783-784 (1984)
- Volland C & Benet LZ
In vitro enantioselective glucuronidation of fenoprofen
Pharmacology **43**:53-60 (1991)
- Volland C, Sun H, Dammeyer J & Benet LZ
Stereoselective degradation of the fenoprofen acyl glucuronide enantiomers and irreversible binding to plasma protein
Drug Metab Dispos **19**:1080-1086 (1991)
- Wade LT, Kenna JG & Caldwell J
Identification of novel hepatic polypeptide antigens in mice treated with nonsteroidal antiinflammatory drugs
14th European Workshop on Drug Metabolism of the European Society for Biochemical Pharmacology, Paris, France (1994)
- Wakabayashi M
Beta-glucuronidases in metabolic hydrolysis. Metabolic conjugation and metabolic hydrolysis
New York : Academic Press :519-602 (1970)
- Walker AM
Quantitative studies of the risk of serious hepatic injury in persons using nonsteroidal antiinflammatory drugs
Arthr & Rheum **40**:201-208 (1997)
- Wang M & Dickinson RG
Disposition and covalent binding of diflunisal and diflunisal acylglucuronide in the isolated perfused rat liver
Drug Metab Dispos **26**:98-104 (1998)
- Ware JA, Graf MLM, Martin BM, Lustberg LR & Pohl LR
Immunochemical detection and identification of protein adducts of diclofenac in the small intestine of rats : possible role in allergic reactions
Chem Res Toxicol **11**:164-171 (1998)
- Weil A, Caldwell J & Strolin-Benedetti M
The metabolism and disposition of ¹⁴C-fenofibrate in human volunteers
Drug Metab Dispos **18**:115-120 (1990)

Williams AM & Dickinson RG

Studies on the reactivity of acyl glucuronides -VI. Modulation of reversible and covalent interaction of diflunisal acyl glucuronide and its isomers with human plasma protein *in vitro*

Biochem Pharmacol **47**:457-467 (1994)

Williams AM, Worrall S, De Jersey J & Dickinson RG

Studies on the reactivity of acyl glucuronides - III. Glucuronide-derived adducts of valproic acid and plasma protein and anti-adduct antibodies in humans

Biochem Pharmacol **43**:745-755 (1992)

Williams AM, Worrall S, De Jersey J & Dickinson RG

Studies on the reactivity of acyl glucuronides. 8. Generation of an antiserum for the detection of diflunisal-modified proteins in diflunisal-dosed rats

Biochem Pharmacol **49**:209-217 (1995)

Williams K, Day R, Knihinicki R & Duffield A

The stereoselective uptake of ibuprofen enantiomers into adipose tissue

Biochem Pharmacol **35**:3403-3405 (1986)

Williams PL & Moffa AC

Identification in human urine of Δ^9 -tetrahydrocannabinol metabolite

J Pharm Pharmacol **12**:445-448 (1980)

Worrall S & Dickinson RG

Rat serum albumin modified by diflunisal acyl glucuronide is immunogenic in rats

Life Sci **56**(22):1921-1930 (1995)

Yamashita A, Watanabe M, Tonegawa T, Sugiura T & Waku K

Acyl-CoA binding and acylation of UDP-glucuronosyltransferase isoforms of rat liver : their effect on enzyme activity

Biochem J **312**:301-308 (1995)

Yokota H, Yuasa A & Sato R

Topological disposition of UDP-glucuronosyltransferase in rat liver microsomes

J Biol Chem **112**:192-196 (1992)

Young JF & Kadlubar FF

A pharmacokinetic model to predict exposure of the bladder epithelium to urinary *N*-hydroxy-arylamine carcinogens as a function of urine pH, voiding interval and resorption

Drug Metab Dispos **10**:641-644 (1982)

Zakim D, Cantor M & Eibl H

Phospholipids and UDP-glucuronosyltransferase. Structure/function relationships

J Biol Chem **263**:5164-5169 (1988)

Zakim D & Dannenberg AJ

How does the microsomal membrane regulate UDP-glucuronosyltransferases

Biochem Pharmacol **43**:1385-1393 (1992)

Zakim D, Hochman Y & Kenney WC

Evidence for an active site arginine in UDP-glucuronosyltransferase

J Biol Chem **258**:6430-6434 (1983)

Zia-Amirhosseini P, Harris RZ, Brodsky FM & Benet LZ

Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs

Nat Med **1**:2-5 (1995)

Zimmerman HJ

Update of hepatotoxicity due to classes of drugs in common clinical use : non-steroidal drugs, anti-inflammatory drugs, antibiotics, antihypertensives, and cardiac and psychotropic agents

Semin Liver Dis **10**:322-338 (1990)

Prénom, Nom :

Nadège TERRIER

Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie et Santé**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le *24 janvier* 2000. n° 346

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



Réactivité de métabolites d'acides carboxyliques (acylglucuronides, acyl CoA) avec les UDP-glucuronosyltransférases.
Etude mécanistique et implications pharmacologiques.

Les acides carboxyliques d'origine exogène tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS, kétoprofène) ou endogène (acide lithocholique, acide rétinolique) sont principalement métabolisés par glucuronocoujugaison. Les acylglucuronides ainsi générés sont des électrophiles réactifs qui se fixent de façon covalente sur les protéines pour former des adduits. Cette réactivité serait à l'origine de certains effets secondaires des médicaments (réactions allergiques, toxicité hépatique).

Notre étude a pour but d'élucider les mécanismes de la réactivité des acylglucuronides et d'identifier les cibles protéiques intracellulaires des adduits. Nous avons montré que le glucuronide de kétoprofène est un inhibiteur irréversible de la glucuronocoujugaison catalysée par les UDP-glucuronosyltransférases (UGT). L'inhibition est concomitante à la formation d'adduits. Nous avons identifié les UGT comme cibles après purification des UGT adduites et révélation avec des anticorps anti-kétoprofène et anti-UGT. Avec une sonde photo-activable, nous avons montré que l'acylglucuronide de kétoprofène se fixe au niveau du site du cosubstrat de la réaction de glucuronocoujugaison, l'acide UDP-glucuronique. Le glucuronide d'acide lithocholique est un inhibiteur irréversible de la glucuronocoujugaison. Au contraire, le glucuronide d'acide rétinolique tout-*trans* ne présente aucune réactivité vis-à-vis des UGT.

Ce travail démontre que les acylglucuronides réagissent à des degrés divers sur les protéines intracellulaires, en particulier les UGT. Ces adduits pourraient être responsables de la présence d'auto-anticorps anti-UGT chez certains patients. Une étude préliminaire est d'ailleurs en cours pour rechercher l'existence de ces autoanticorps chez des patients atteints d'hépatite.

Une approche complémentaire a consisté à caractériser l'isoforme humaine UGT2B7. Après expression de l'ADNc dans les cellules V79, nous avons montré que l'enzyme métabolisait les AINS carboxyliques, certains stéroïdes hormonaux et l'acide hyodéoxycholique. L'utilisation d'agents de modification chimique et de sondes photo-activables nous a permis de mettre en évidence un acide aminé carboxylique important pour la fonction de la protéine.

En conclusion, ce travail permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la formation d'adduits et leurs implications pharmacologiques.

Reactivity of carboxylic acid metabolites (acylglucuronides, acyl CoA) with UDP-glucuronosyltransferases.
Mechanistic study and pharmacological implications.

Carboxylic acids, from exogenous origin, such as the nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID, ketoprofen) or naturally present (lithocholic, retinoic acids) are mainly glucuronidated. The corresponding acylglucuronides are electrophilic, reactive species which covalently bind to proteins into adducts. This reactivity is believed to be responsible for some adverse effects of drugs (allergic reactions, hepatic toxicity).

The aim of our study is to elucidate the mechanisms of the reactivity of acylglucuronides and identify the intracellular protein targets of the adducts. We have shown that ketoprofen acylglucuronide could irreversibly inhibit the glucuronidation catalyzed by UDP-glucuronosyltransferases (UGT). The inhibition was strongly related to the formation of the adducts. UGT were identified as targets on the basis of the purification of the UGT adducts and recognition with antibodies raised against ketoprofen and UGT. With a photoaffinity probe, we have shown that ketoprofen acylglucuronide bound at the co-substrate (UDP-glucuronic acid) binding site. Lithocholic acid glucuronide behaved as an irreversible inhibitor of the glucuronidation reaction. By contrast, all-*trans* retinoic acid glucuronide did not exhibit any reactivity against UGT.

This work demonstrates that the acylglucuronides react, to various extents, with intracellular proteins, namely UGT. These adducts could be responsible for the presence of auto-anti-UGT antibodies in some patients. A preliminary study has been performed in order to look precisely for the existence of such antibodies in patients with hepatitis diseases.

As a complimentary approach, the characterization of the human liver UGT2B7 has been undertaken. Upon expression of the cDNA in V79 cells, we have shown that the enzyme could glucuronidate carboxylic NSAIDs, some steroid hormones and hyodeoxycholic acid. With amino acid modifying reagents along with photoaffinity probes, we have shown the presence of a carboxyl amino acid that is important for the function of UGT2B7.

In conclusion, this work provides a better knowledge on the molecular mechanisms of the adduct formation and highlights the possible pharmacological implications in human.